

---

**„Anpassung von *Nodularia spumigena* CCY9414 an abiotische Stressfaktoren“**

**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock**



**vorgelegt von**

**Fred Möke**

geboren am 26.12.1982 in Kyritz

**Rostock 2013**

---

**Betreuer:** Universitätsprofessor Dr. Hermann Bauwe

**Gutachter:** Universitätsprofessor Dr. Hermann Bauwe,  
Institut für Biowissenschaften, Pflanzenphysiologie

Universitätsprofessor Dr. Gerhard Graf,  
Institut für Biowissenschaften, Meeresbiologie

**Datum der Einreichung:** 20. September 2013

**Datum der Verteidigung:** 13. Dezember 2013

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>iv</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>vi</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>ix</b>
<b>Summary.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Blütenbildung.....	2
1.2 Ostsee als Blütenhabitat .....	2
1.3 Salinität.....	4
1.4 Phosphor .....	5
1.5 Starklicht und hohe Sauerstoffkonzentrationen .....	6
1.6 Photorespiration .....	7
1.7 <i>Nodularia spumigena</i> .....	9
1.8 <i>Nodularia spumigena</i> CCY9414 .....	10
1.9 Zielstellung der Arbeit .....	13
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.1 Allgemeines.....	14
2.2 Materialien .....	14
2.2.1 Organismen .....	14
2.2.2 Klonierungsstamm .....	14
2.2.3 Chemikalien und Puffer.....	14
2.2.4 Enzyme.....	14
2.2.5 Marker und Standards.....	15
2.2.6 Oligonukleotide/Primer .....	15
2.2.7 Vektorsysteme .....	15
2.3 Methoden.....	16
2.3.1 Molekularbiologische Methoden .....	16
2.3.2 Kultivierung .....	20
2.3.3 Untersuchungsprotokoll .....	22
2.3.4 <i>In silico</i> -Analysen .....	22
2.3.5 RNA-Seq (Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung) .....	23
2.3.6 Wachstumsfluometrie.....	23

2.3.7	Trockenmassenbestimmung .....	23
2.3.8	Chlorophyllbestimmung .....	24
2.3.9	Gaschromatographie .....	24
2.3.10	Aminosäureanalysen mittels HPLC .....	26
2.3.11	Flammenphotometrie .....	27
2.3.12	Elektronenmikroskopie .....	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b><i>In silico</i>-Analysen .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Etablierung des Kultursystems .....</b>	<b>32</b>
3.2.1	Wachstumsmessung .....	33
<b>3.3</b>	<b>Salzstress .....</b>	<b>34</b>
3.3.1	Analyse niedermolekularer Stoffe .....	36
3.3.2	Expressionsanalysen .....	39
3.3.3	Gaschromatographische Analysen an Freilandproben .....	40
<b>3.4</b>	<b>Licht- und O<sub>2</sub>-Stress .....</b>	<b>41</b>
3.4.1	Versuchsaufbau .....	41
3.4.2	HPLC-Analysen .....	42
3.4.3	Expressionsanalysen .....	42
3.4.4	Expression der Nodularin-Synthetase .....	45
3.4.5	Globale Änderungen im Genexpressionsmuster durch RNAseq .....	45
<b>3.5</b>	<b>Phosphatmangel .....</b>	<b>58</b>
3.5.1	Versuchsdurchführung .....	58
3.5.2	Wachstum als Trockenmasseveränderung .....	58
3.5.3	Nachweis von Polyphosphaten durch Elektronenmikroskopie .....	60
3.5.4	Verifizierung der polyP-Granula durch EELS bzw. ESI .....	64
3.5.5	Expressionsanalysen in Phosphat-limitierten Zellen .....	66
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
<b>4.1</b>	<b><i>In silico</i>-Analysen .....</b>	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>Salzstress .....</b>	<b>69</b>
<b>4.3</b>	<b>Starklicht .....</b>	<b>71</b>
<b>4.4</b>	<b>Phosphor .....</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>

<b>Danksagung.....</b>	<b>I</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>III</b>
<b>Erklärung .....</b>	<b>IV</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>V</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
CCY	Culture Collection Yerseke
cDNA	Copy DNA
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.,	und andere
GC	Gaschromatographie
GG	Glucosylglycerol
GGA	Glucosylglycerat
H <sub>2</sub> O	Wasser
HL	Starklicht
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography
Kb	Kilobasenpaare
Konz.	Konzentration
LB	lysogeny broth (Bakterienmedium)
Lsg.	Lösung
M	Molare Masse
Mol	Mol (Stoffmengeneinheit)
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
P	Phosphor
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
P <sub>i</sub>	anorganische Phosphate
PSU	Practical Salinity Units

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
sp.	Spezies
spp.	Plural von sp.
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TSS	transcriptional start sites (Transkriptionsstartpunkte)
UV	Ultraviolett

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Satellitenbild der Ostsee mit cyanobakterieller Sommerblüte (links) und Darstellung der Salzkonzentrationen in der Ostsee (rechts) .....	3
Abbildung 2:	Photorespiration als mögliche Anpassungsstrategie .....	8
Abbildung 3:	<i>Nodularia spumigena</i> ist ein fadenförmiges Cyanobakterium .....	10
Abbildung 4:	16s rRNA Stammbaum .....	12
Abbildung 5:	Vergleich der Beschaffenheit von <i>Nodularia</i> CCY9414 .....	20
Abbildung 6:	Medienvergleich .....	21
Abbildung 7:	Fluoreszenzmikroskopie .....	32
Abbildung 8:	Graphische Darstellung des Wachstums .....	33
Abbildung 9:	Wachstum von <i>Nodularia</i> CCY9414 bei verschiedenen Salzgehalten .....	34
Abbildung 10:	Zunahme der Chl- <i>a</i> -Konzentration .....	35
Abbildung 11:	Saccharosekonzentration in Abhängigkeit zur Salinität .....	36
Abbildung 12:	Zunahme der Glutamatkonzentration in Abhängigkeit von der Salinität .....	38
Abbildung 13:	Kaliumkonzentration in Abhängigkeit von der Salinität .....	38
Abbildung 14:	Genexpressionsanalysen in Abhängigkeit von der Salinität .....	39
Abbildung 15:	Saccharosekonzentration in Abhängigkeit zum Standort .....	40
Abbildung 16:	Licht- und O <sub>2</sub> -Stressversuch .....	41
Abbildung 17:	RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung der <i>ocp</i> und <i>sodB</i> Expressionsstärke .....	43
Abbildung 18:	RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung der Expressionsstärke photorespiratorischer Gene .....	44
Abbildung 19:	RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung der <i>isiA</i> und <i>fadA</i> Expressionsstärke .....	44
Abbildung 20:	RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung der <i>ndaF</i> Expressionsstärke .....	45
Abbildung 21:	Relative Expression von spezifisch Sauerstoff-beeinflussten Genen .....	48
Abbildung 22:	Relative Expression von ausgewählten Genen .....	50
Abbildung 23:	Relative Expression von Starklicht-beeinflussten Genen .....	51
Abbildung 24:	Relative Expression von Starklicht-beeinflussten Genen .....	51



Abbildung 25:	Screenshot des Artemis-Reads-Diagramm des Mycosporin-Clusters.....	52
Abbildung 26:	Relative Expression von <i>ncf2285700</i> .....	53
Abbildung 27:	Relative Expression von <i>ocp</i> und <i>sodB</i> .....	54
Abbildung 28:	Relative Expression photorespiratorischer Gene.....	54
Abbildung 29:	Relative Expression von <i>isiA</i> und <i>fadA</i> .....	56
Abbildung 30:	Relative Expression von <i>ndaF</i> .....	57
Abbildung 31:	Fotografische Dokumentation der Veränderungen in der Trockenmasse .....	59
Abbildung 32:	Zunahme der Trockenmasse im Phosphatmangelversuch.....	59
Abbildung 33:	Aufnahme eines <i>Nodularia</i> CCY9414 Filaments (TEM).....	60
Abbildung 34:	TEM-Aufnahmen von <i>Nodularia</i> CCY9414-Fäden nach 0 und 4 Tagen.....	61
Abbildung 35:	Mikroskopische Aufnahmen von <i>Nodularia</i> CCY9414-Fäden (TEM) nach 10 und 18 Tagen .....	62
Abbildung 36:	Quantitative Auswertung der polyP-Vorkommen Nitrat-haltig .....	63
Abbildung 37:	Quantitative Auswertung der polyP-Vorkommen Nitrat-frei .....	64
Abbildung 38:	EELS-Spektrum .....	65
Abbildung 39:	ESI 3-Fenster-Methode.....	65
Abbildung 40:	Phosphatnachweis in TEM Bildern von <i>Nodularia</i> CCY9414.....	66
Abbildung 41:	Expressionsmuster verschiedener Gene in Zellen von <i>Nodularia</i> CCY9414 nach Phosphatmangel.....	66

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	<i>in silico</i> -Analysen zur Identifizierung von Genen für photorespiratorische Enzyme .....	29
Tabelle 2:	<i>in silico</i> -Analysen zur Identifizierung von Genen für charakteristische Stressproteine .....	30
Tabelle 3:	<i>in silico</i> -Analysen zur Identifizierung von Genen für Enzyme zur Nodularinsynthese .....	31
Tabelle 4:	HPLC-Analysen .....	37
Tabelle 5:	Glycin-Serin-Verhältnis .....	42
Tabelle 6:	Globale Auswertung der RNAseq-Analysen (erhöhte Genexpression).....	47
Tabelle 7:	Globale Auswertung der RNAseq-Analysen (verminderte Genexpression).....	47
Tabelle 8:	Top 25 der lichtinduzierten gTSS .....	49

## Zusammenfassung

Cyanobakterien sind die einzigen oxygen phototrophen Prokaryoten auf der Erde und spielen eine wichtigen Rolle beim globalen C- und N-Kreislauf. In der zentralen Ostsee treten praktisch jeden Sommer Massenentwicklungen von toxischen Cyanobakterien auf, die durch Stämme des Cyanobakteriums *Nodularia spumigena* dominiert werden (Sivonon et al., 2007). Die molekulare Grundlage der Blüten-Entstehung sowie deren Anpassungsstrategien an abiotische Faktoren sind bisher nur sehr schlecht untersucht. Mit Hilfe von *Nodularia spumigena* CCY9414, einem Isolat aus der Ostsee-Spätsommerblüte dessen Genom verfügbar ist, war es möglich, molekulare Anpassungsstrategien an einzelnen Faktoren der Blütenbildung (Salinität, Nährstoffverfügbarkeit, Starklicht und hohe Sauerstoffkonzentrationen) zu untersuchen. Dafür wurden in dieser Arbeit mehrere molekulare Untersuchungsprotokolle sowie eine definierte Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen für *Nodularia* CCY9414 etabliert. Weiterhin wurden durch Nutzung bekannter Datenbanken wie NCBI und CyanoBase für bekannte Stressproteine, Gene im Genom von *Nodularia* CCY9414 identifiziert.

Die molekularen Untersuchungen untermauern die optimale Anpassung von *Nodularia* CCY9414 an die vorherrschenden abiotischen Umweltfaktoren während der Blütenbildung. So zeigte der Stamm optimales Wachstum bei Salinitäten, die für die zentrale Ostsee charakteristisch sind. Saccharose stellte das Hauptosmolyt dar. Es waren auch keine Anzeichen für eine unspezifische Stressantwort beim Wachstum in Brackwassersalinitäten zu beobachten.

An die während der Spätsommerblüte tagsüber vorherrschenden Lichtstärken von durchschnittlich 1000  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Evans et al., 2000) und dadurch resultierende hohe Sauerstoffkonzentrationen scheint *Nodularia* CCY9414 durch die Expression vieler Lichtschutzproteine und Energielöschungsmechanismen (*ocp*, *sodB*, Mycosporine, Carotinoide...) sehr gut adaptiert. Mit Hilfe von RNAseq wurde die globale Veränderung des Transkriptoms an diese Bedingungen untersucht. Neben vielen bekannten Mechanismen kam es auch zur Expression von Genen für bisher unbekannte Proteine, die eine Rolle bei der Anpassung an Licht- und oxidativen Stress spielen können.

Die Verfügbarkeit von Phosphor stellt einen der am häufigsten diskutierten Faktoren für die Induktion der Blüte diazotropher Cyanobakterien in der Ostsee dar (Wulff et al., 2007). In den Experimenten mit *Nodularia* CCY9414 konnte eine starke Expression von P-Transportsystemen (*pptS* für ein Phosphate/Phosphonat-ABC-Transportsystem)

und eine hocheffiziente P-Speicherung unter P-Mangel nachgewiesen werden. Allerdings waren die Zellen bei Langzeitlimitation mit P-Quellen nicht in der Lage, das gespeicherte Polyphosphat zu nutzen, es kam sogar zu einer verstärkten Akkumulation von Polyphosphat-Granula.

Die in dieser Arbeit konzipierten und optimierten Untersuchungsprotokolle ermöglichen die Verwendung von *Nodularia* CCY9414 als zukünftigen Modellstamm für weitere gezielte molekularbiologische Untersuchungen hinsichtlich der Anpassungsstrategien für eine Blütenbildung im Labor sowie potentiell auch im Freiland.

## Summary

Cyanobacteria are the only Prokaryotes performing oxygenic photosynthesis. They play an important role in the global C- und N-cycles on Earth. Practically every summer, strains of *Nodularia spumigena* form massive toxic cyanobacterial blooms in the central Baltic Sea (Sivonon et al., 2007). However, the molecular basis for bloom formation and the acclimation of blooming cyanobacteria towards diverse environmental stresses are only fragmentary understood.

Using *Nodularia spumigena* CCY9414, an isolate from a Baltic Sea bloom with known genome sequence, molecular acclimation strategies towards factors characteristic for the bloom situation such as salinity, nutrient limitation, high light and oxidative stress were investigated. The cultivation and molecular methods were optimized for the work with *Nodularia* CCY9414. Moreover, public databases such as NCBI or CyanoBase were used to annotate genes coding for proteins involved in defined cyanobacterial stress acclimation processes.

The molecular investigations support the notion that *Nodularia* CCY9414 is optimally adapted toward the brackish water conditions of the central Baltic Sea. The strain grew optimally at salinities found in its natural habitat. It accumulated sucrose as major compatible solute. At brackish salinities *Nodularia* CCY9414 cells showed no indications for unspecific stress.

Cyanobacterial cells are exposed to high light intensities of about 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Evans et al., 2000) and high oxygen partial pressures during the bloom period. *Nodularia* CCY9414 is adapted to these harsh conditions by the expression of light protective proteins involved in diverse acclimation processes (*ocp*, *sodB*, mycosporines, carotenoids, etc.). Using RNAseq, global transcriptomic changes at these conditions were investigated. Additional to the expression of diverse genes for known stress proteins, the specific up-regulation of proteins for yet unknown stress acclimation processes also was found.

The availability of P-sources is often discussed as an important bloom-regulating factor among diazotrophic cyanobacteria of the Baltic Sea (Wulff et al., 2007). The investigation of P-limited cells of *Nodularia* CCY9414 revealed a strong induction of genes for P-transporters such as *pptS* (codes for a phosphate/phosphonate-ABC-transporter) and an increased storage of phosphate in polyphosphate granules. However, even after long-term P-limitation the cells were not re-assimilating the P-storage, the number of poly-phosphate granula increased and growth was completely stopped.

The methods and the knowledge on stress acclimation of *Nodularia* CCY9414 will support the use of this strain as model strain for the future investigation of cyanobacterial bloom formation in laboratory as well as field experiment.

## 1 Einleitung

Cyanobakterien sind die einzigen oxygenen phototrophen Prokaryoten auf der Erde. Sie entstanden vor etwa 3 Milliarden Jahren und beeinflussen seit dieser Zeit biogeochemische Prozesse, insbesondere den Kohlenstoff- und Stickstofffluss (Kirschvink und Koop, 2008). Heute sind sie in fast allen Ökosystemen vertreten (Nübel et al., 2000; Garcia-Pichel et al., 2001). Durch den via Photosynthese entstandenen Sauerstoff wurde die Atmosphäre unseres Planeten entscheidend verändert. Nach endosymbiontischer Aufnahme eines Cyanobakteriums, welches sich zu Plastiden entwickelte (Yoon et al., 2004), trugen später auch phototrophe Eukaryoten zur Anreicherung von Sauerstoff bei. Daneben sind Cyanobakterien wichtige Primärproduzenten, die aus Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) organischen Kohlenstoff bilden (Scanlan et al., 2009). Durch die Fixierung von atmosphärischem Stickstoff beeinflussen einige Cyanobakterien zusätzlich zum globalen Kohlenstoffkreislauf auch den marinen Stickstoffkreislauf (Stal, 2009). Die marinen Stickstofffixierer *Trichodesmium erythreum* (Bergman et al., 2012) und *Crocospaera watsonii* (Grosskopf und Laroche, 2012) sowie symbiontische Arten, wie *Richelia* sp. (Foster et al., 2011) und UCYN\_A (Thompson et al., 2012) sind von besonderer Bedeutung für den globalen Stickstoffkreislauf. Daher stellen Cyanobakterien in marinen und einigen Süßwassersystemen die dominierende Gruppe an Phytoplankton dar und erfüllen vielfältige ökologische Funktionen.

Der ökologische Erfolg von Cyanobakterien basiert hauptsächlich auf Ihrer Fähigkeit zur Anpassung an verschiedene Umweltfaktoren, (z.B. verschiedenen Salzkonzentrationen, Hagemann, 2011; Lichtschutz, Bailey und Grossman, 2008).

Das kann dazu führen, dass Cyanobakterien in großen Massen, so genannten Blüten, auftreten können. Blütenbildende Cyanobakterien besitzen Gasvakuolen, welche eine vertikale Migration erlauben und zur Aggregation beitragen (Sivonen et al., 2007). Die Regulation der vertikalen Positionierung in der geschichteten Wassersäule erfolgt durch Akkumulation/Abbau von Ballast (hauptsächlich Glykogen). Dieser fungiert als Gegengewicht zum Auftrieb der Zelle (Koloniegröße und zellulärer Gasgehalt). Eine wichtige Rolle bei der Koloniebildung von Cyanobakterien scheinen bioaktive Verbindungen, wie beispielsweise Microcystin zu spielen. Neben ihrer Rolle als Informationssubstanzen können sie auch gegen oxidativen Stress schützen (Schatz et al., 2007; Zilliges et al., 2011).

## 1.1 Blütenbildung

Trotz der hohen medialen Aufmerksamkeit für das Phänomen der Cyanobakterienblüten (z.B. <http://www.welt.de/wissenschaft/umwelt/article8563148/Riesiger-Blualgen-Teppich-schwimmt-auf-der-Ostsee.html>), ist die molekulare Grundlage der Blüten-Entstehung nur sehr schlecht untersucht (diskutiert in Huber et al., 2012). Nach bisherigem Kenntnisstand wird folgendes Szenario für die Ostsee diskutiert. Die Frühjahrsblüte, welche von Diatomeen dominiert wird, verbraucht fast das gesamte Nitrat in der euphotischen Zone. Mit dem Anstieg der Temperatur in der oberen Wassersäule wird diese geschichtet und das Phytoplankton vom nährstoffreichen tieferen Wasser separiert. Unter diesen Bedingungen haben N<sub>2</sub>-fixierende Cyanobakterien einen Vorteil, da sie unabhängig von vorhandenen Stickstoffquellen wachstumsfähig sind. Die Entstehung von dicken Oberflächenblüten bewirkt zum einen eine Verbesserung der CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit und zum anderen reduziert sie die Lichteinstrahlung für Phytoplankton in der tieferen Wassersäule. Darüber hinaus bietet die vertikale Wanderung den Gasvakuolen-bildenden Cyanobakterien die Möglichkeit in tiefere, nährstoffreichere Schichten vorzudringen (Sivonen et al., 2007). Die Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Eisen (Alexova et al., 2011) oder Phosphaten (Harke et al., 2012) wird oft als zusätzlicher potenzieller blütenfördernder Faktor diskutiert. Es wird prognostiziert, dass der Klimawandel und die Eutrophierung von Gewässern mit hoher Wahrscheinlichkeit das Auftreten von schädlichen Cyanobakterienblüten in Zukunft erhöhen (Huber et. al., 2001; Paerl und Huisman, 2008; Paerl und Paul, 2012).

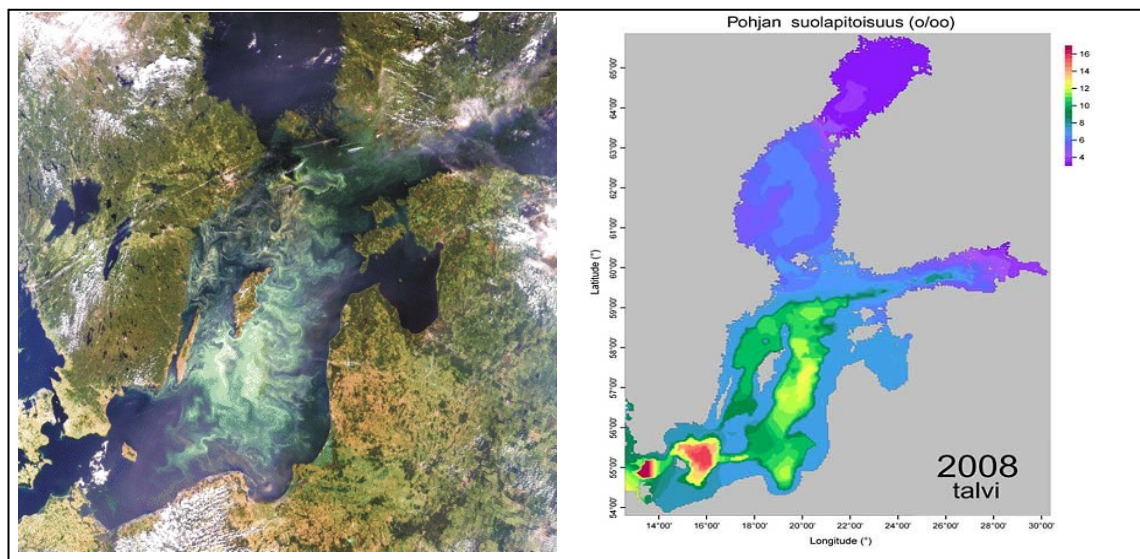
Das Phänomen der Blütenbildung ist sehr schwierig im Labor zu studieren, da multiple natürliche Einflussfaktoren nicht simuliert werden können. Aber auch Studien in der natürlichen Umwelt sind schwierig durchzuführen, da hier der Zusammenhang zwischen Vorkommen oder Ausbleiben von Blüten in Bezug auf externe Faktoren nur schwer zu beweisen ist.

## 1.2 Ostsee als Blütenhabitat

Die Ostsee ist ein Binnenmeer am östlichen Rand des Atlantiks. Dieses Brackgewässer zeichnet sich durch einen nordöstlich-südwestlichen Salzgradienten aus (Abbildung 1, Bild 2). *Microcystis*-Blüten kommen vorwiegend in den nördlichen Küstengewässern vor, welche von geringen Salinitäten mit großen Mengen an einströmendem Süßwasser geprägt sind. In der zentralen Ostsee treten praktisch jeden Sommer Blüten auf, die durch Stämme der Cyanobakterien *Nodularia*



*spumigena* bzw. *Aphanizonemon flos-aque* dominiert werden (Abbildung 1, Bild 1, Sivonen et al., 2007). Obwohl die Sommerblüte eines der Hauptcharakteristika der zentralen Ostsee mit weitreichenden Konsequenzen für das Ökosystem ist, sind die genauen Voraussetzungen für Beginn und Ende der Blüte, die vorherrschenden Limitierungen sowie die Budgets der involvierten Nährstoffe bei weitem nicht vollständig geklärt.



**Abbildung 1: Satellitenbild der Ostsee mit cyanobakterieller Sommerblüte (links) und Darstellung der Salzkonzentrationen in der Ostsee (rechts).** Bild 1 <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/275/1644/F1.medium.gif> ; Bild 2 [http://www.itameriportaali.fi/en/ajankohtaista/mtl\\_uutisarkisto/2008/en\\_GB/mnemiopsis](http://www.itameriportaali.fi/en/ajankohtaista/mtl_uutisarkisto/2008/en_GB/mnemiopsis).

Der Klimawandel der letzten Jahre, vor allem in Bezug auf die höheren Temperaturen des Wassers, führt zu einer schnellen Vermehrung der Cyanobakterien. Da zu diesem Zeitpunkt gute Vermehrungsbedingungen herrschen, tauchen sie im Sommer gehäuft auf. Eine der Haupterklärungen (Huber et al., 2012) hierfür ist, dass immer mehr Nährstoffe, insbesondere Phosphat, für die Cyanobakterien in das Wasser gelangen, die auch für den Anstieg der Population der Cyanobakterien verantwortlich sind. Diese übermäßige Anreicherung des Wassers mit Nährstoffen nennt man Eutrophierung. Diese Stoffe sind auch in Düngemitteln enthalten, die von bewirtschafteten Landstrichen an der Ostsee stammen. Bei Regen werden die Nährstoffe größtenteils ins Wasser gespült, wodurch die Versorgung der Cyanobakterien gesichert wird. Flüsse, die in die Ostsee münden, wie beispielsweise die Weichsel oder die Oder, befördern zusätzlich Düngemittel ins Meerwasser.

### 1.3 Salinität

Ein wichtiger Faktor für das Überleben von Organismen in der Ostsee ist die Anpassung an die vorherrschenden Salinitäten. Durch Studien von Hagemann und Kollegen ist die Physiologie, Biochemie und Molekularbiologie der cyanobakteriellen Salzanpassung am Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 in Grundzügen aufgeklärt. Diese Untersuchungen zeigten, dass neben der Regulation des Ionengehaltes vor allem der Synthese von niedermolekularen Schutzsubstanzen (Osmolyten, compatible solutes) eine besondere Bedeutung zukommt. Bei marinen Stämmen ist Glucosylglycerol (GG) entscheidend für den Salzstressschutz, während Trehalose sowie Saccharose bei terrestrischen und Süßwasser-Stämmen die dominierende osmoprotektive Substanz darstellen. Da diese Verbindungen keine Nettoladung tragen, gut in Wasser löslich, osmotisch aktiv sowie inert sind, können sie in hoher Konzentration im Cytoplasma akkumuliert werden und das Wasserpotential erniedrigen. Daneben schützen sie Makromoleküle wie Proteine und Membranen, da sie aus deren Hydrathülle ausgeschlossen werden und das verfügbare Wasser an den Makromolekülen verbleibt (Bremer und Krämer, 2000).

Bereits 1986 konnten Reed et al. nachweisen, dass eine Akkumulation von Saccharose und Trehalose zum Beispiel *Anabaena* sp. PCC 7120 vor geringem Salzstress schützt. Bei Cyanobakterien (*Synechocystis* sp. 6803 und *Synechococcus* sp. PCC 7002) mit höheren Salztoleranzen (bis 0,7 M NaCl) wird GG zur Osmoadaptation angereichert. Neueste Untersuchungen ergaben, dass bei einigen marinen Cyanobakterien zusätzlich zu GG das Glucosylglycerat (GGA) als Osmolyt wirkt (Klähn et al., 2009). Glycinbetain wirkt beim hypersalinen (bis zu 2,7 M NaCl) Stamm *Aphanothece halophytica* als compatible solute (Reed et al., 1986). Saccharose ist vorwiegend bei Photosynthese betreibenden Cyanobakterien wirksam. Für den Modellstamm *Anabaena* sp. PCC 7119, welcher zur Gruppe Nostocales gehört, konnte ein maximales Wachstum unter Süßwasserbedingungen und eine Anpassung an salziges Brackwasser mittels Saccharose-Akkumulation durch die Saccharosephosphat-Synthase gezeigt werden (Porchia und Salerno, 1996). Die Bildung von Saccharose aus UDP-Glukose und Fruktose-6-phosphat ist ähnlich der pflanzlichen Synthese und wird durch die zwei Enzyme Saccharose-6-Phosphat Synthase (SPS) und Saccharose-6-Phosphat Phosphatase (SPP) katalysiert, wobei Saccharose-6-phosphat (Suc6P) als Zwischenprodukt entsteht (Hagemann, 2011).

## 1.4 Phosphor

Phosphor (P) ist in pflanzlichen Organismen ein essentielles Nährelement und als Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) an vielen Funktionen und Stoffkreisläufen beteiligt. Man findet es für Energieflüsse im Adenosintriphosphat (ATP), als Bestandteil von Fetten, Nukleinsäuren und Membranphospholipiden (Degerholm et al., 2006). Im Gegensatz zu Stickstoff liegt Phosphor bereits in Form des für Organismen verfügbaren Phosphats vor, das aus der Erosion von Gestein sowie aus Einträgen der Flüsse durch die Landwirtschaft und Industrie stammt. Die Rolle von gelöstem Phosphat als limitierender Faktor für die räumliche und zeitliche Verteilung von diazotrophen Cyanobakterien in der Ostsee wird schon lange diskutiert (Niemi, 1979). Weiträumige Cyanobakterienblüten treten erst auf, wenn das Phosphat bereits weitgehend verbraucht ist. Das aus der Frühjahrsblüte (Rydin et al., 2002) überschüssige Phosphat im Oberflächenwasser reicht vermutlich für die Spätsommerblüte nicht aus (Wasmund et al., 2005; Nausch et al., 2008 b). Für *Anabaena* spp. konnte ein Abfallen der Respirationsrate (Senft, 1978) und der Stickstofffixierung (Stewart und Pearson, 1970) bei gleichzeitiger Phosphatabnahme beobachtet werden.

Ein großer Forschungsschwerpunkt besteht derzeit in der Suche nach alternativen P-Quellen für die Blütenbildung (z.B. Lass et al., 2010). Vahtera et al. (2007) beobachteten bei Phosphatmangel die Abnahme von Polyphosphaten und eine gleichzeitige Zunahme der Aktivitäten der alkalischen Phosphatasen, die zur Freisetzung von Phosphat aus organischen Phosphatverbindungen dienen sollen. Die Bestimmung des Phosphors in den untersuchten Zellen erfolgte mittels Energie-Röntgen-Analysen. Anorganische Polyphosphate (polyP) sind Polymere von bis zu Hunderten von Phosphatresten. Die Verbindungen kommen in fast allen Organismen (Pilze, Pflanzen und Tiere) vor (Kualey, 1979). Die Polyphosphatkinase (PPK) katalysiert deren Bildung durch die reversible Übertragung der endständigen Phosphatgruppe des ATP auf langkettige Polyphosphatvorläufermoleküle (Ahn und Kornber, 1990). Zur Speicherung akkumulieren sie in sogenannten Granula, welche elektronenmikroskopisch als dunkle Einschlusskörper sichtbar sind (Janson et al., 1994; Vahtera et al., 2007).

Zur Aufklärung der Frage nach der Phosphatversorgung von Cyanobakterienblüten und den daran beteiligten Mechanismen gibt es wenige Arbeiten mit molekularbiologischer Fragestellung (Su et al., 2007; Orchard et al., 2009; Scanlan et al., 2009). Voß et al. (2013) analysierten auf Grundlage bisheriger Untersuchungen zur Versorgung mit anorganischem Phosphat die Genausstattung im *Nodularia*

*spumigena* CCY9414 Genom. *Nodularia spumigena* besitzt umfangreiche Möglichkeiten zum P-Erwerb, die deutlich vielfältiger als beim Modellcyanobakterium *Synechocystis* sp. 6803 sind. So kodiert das Genom P-Aufnahmesysteme mit niedriger Affinität (ähnlich dem *E. coli* PitA System) und mit hoher Affinität (PstABC und PstS) für anorganische Phosphate ( $P_i$ ). Die Expression dieser Gene erhöhte sich bei Untersuchungen im Modellorganismus *Synechocystis* sp. 6803 drastisch, wenn dieser einer Phosphatlimitation ausgesetzt wurde (Pitt et al., 2010). Diese  $P_i$ -Aufnahmesysteme mit unterschiedlichen Affinitäten ermöglichen *Nodularia spumigena* die Aufnahme von Phosphat unterschiedlicher Konzentrationen. Ein Regulator für Arsen-Resistenz befähigt *Nodularia* zusätzlich zur Aufnahme von  $P_i$  aus Tiefenwasser, welches  $P_i$  kotransportiertes Arsen enthält (Cutter et al., 2001). Im Genom gibt es nicht nur Gene für die Aufnahme von  $P_i$  (5-wertig +5), sondern auch für 3-wertige (+3) Phosphonate und Phosphite, wie sie nur in wenigen Cyanobakterien vorkommen (Dyhrman und Haley, 2006; Martinez et al., 2010). Auch für die Aufnahme von organischen Phosphorverbindungen konnte in bioinformatischen Analysen ein weites Spektrum an Systemen vorhergesagt werden (Voss et al., 2013). Ein typisches Enzym für die Nutzung organischer Phosphate ist alkalische Phosphatase, die in vielen Cyanobakterien vorkommt (Ray et al., 1991; Scanlan et al., 2009).

### 1.5 Starklicht und hohe Sauerstoffkonzentrationen

Die durch Photosynthese gewonnene Energie nutzen Cyanobakterien vor allem zur  $CO_2$ -Fixierung und setzen dabei große Mengen an Sauerstoff frei. Sie stellen somit einen wichtigen Primärproduzenten für die Ostsee dar. Zu viel Lichteinstrahlung und schwankende Lichtintensitäten, wie sie in einem Tagesrhythmus stattfinden, führen zu einem Ungleichgewicht im Photosyntheseapparat und einem möglichen Überschuss an Anregungsenergie. Diese überschüssige Energie kann zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species: ROS) (Hihara et al., 2001), wie Superoxidradikalen ( $O_2^{\cdot}$ ), Hydroxylradikalen ( $OH^{\cdot}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) führen und die Zellen schwer schädigen. Diese greifen bevorzugt das Protein D1 des Photosystem II-Komplexes an. Übersteigt die Rate der D1-Proteinzerstörung die Zahl/das Maß der reparierten Proteine führt das zur Photoinhibition (Aro et al., 1993; Nishiyama et al., 2001; Takahashi et al., 2007). Cyanobakterielle Schutzmechanismen gegen Starklicht sind recht gut bekannt. So kann es zu Fluchtreaktionen (Castenholz und Garcia-Pichel, 2000), Ausbildung von Schutzpigmenten (Edge et al., 1997), Anreicherung von Hli-Proteinen (High light

inducible) und vielen mehr kommen (Bhaya et al., 2002). Dass Mycosporine und ähnliche Aminosäuren (MAAs) eine wichtige Rolle bei Schutz vor UV-Strahlung, vor allem in Cyanobakterien spielen, wurde durch eine Reihe von Arbeiten schon belegt (Sinha et al., 2001; Liu et al., 2004; Rezanka et al., 2004). MAAs sind wasserlösliche Moleküle, welche UV-Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 310-365 nm absorbieren (Oren und Gunde-Cimerman, 2007). Arbeiten hinsichtlich ihrer Biosynthese zeigen Verbindungen zu ersten Schritten des Shikimatweges auf (Singh et al., 2008). Wilson et al. (2006) beschrieben die essentielle Bedeutung des *orange-carotinoid-protein* (OCP) bei der Adaptation an Starklichtverhältnisse. Mit Hilfe des Modellorganismus *Synechocystis* sp. 6803 stellten sie eine Beteiligung von OCP an nicht-photochemischem Quenching und einer damit verbundenen Abgabe von überschüssiger Energie in Form von Wärme fest. Dies bewirkt eine Unterbrechung der Weiterleitung der Energie zu den Reaktionszentren (Bailey und Grossman, 2008). Als Enzym zur Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies gilt die Superoxid-Dismutase (SOD). In Cyanobakterien gibt es verschiedene Typen der SOD, darunter eine eisenabhängige, die durch *sodB* kodiert wird. Deren wichtige Funktion bei der Bekämpfung von Sauerstoffradikalen wurde sowohl bei *E. coli* (Fridovich, 1995), bei Pflanzen (Alscher et al., 2002) und bei *Synechocystis* sp. 6803 (Kim und Suh, 2005) untersucht. Zusätzlich wurde von Hackenberg et al. (2009) die Photorespiration als Mechanismus zum Schutz vor Photoinhibition vorgeschlagen.

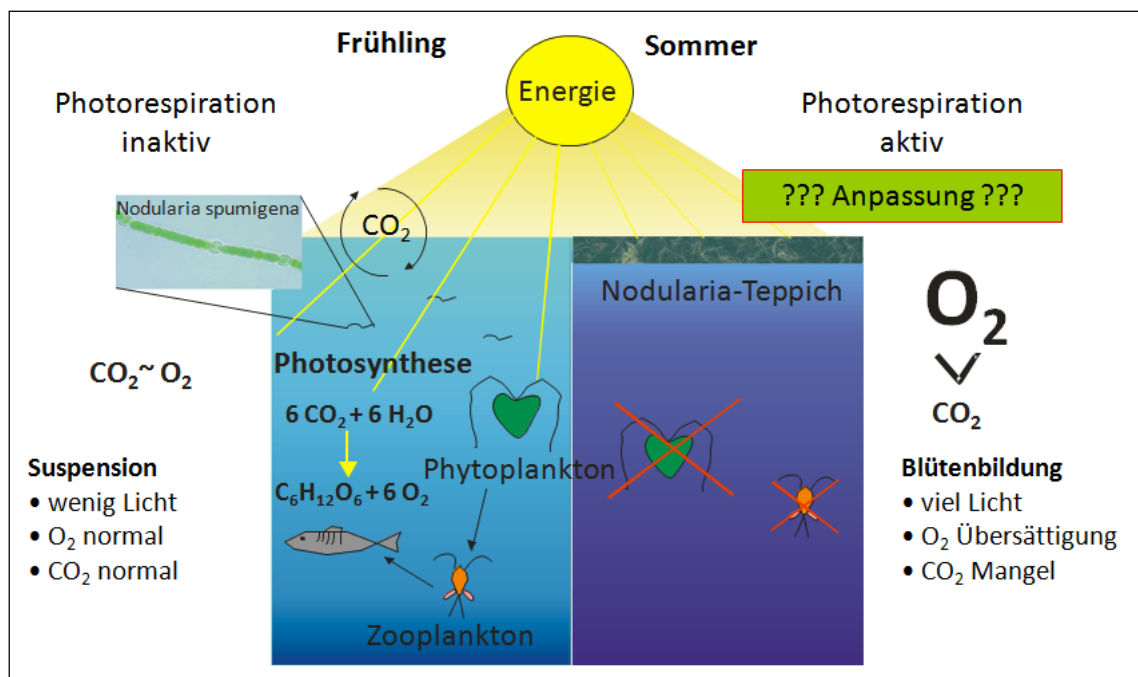
## 1.6 Photorespiration

Die Photorespiration (auch: photorespiratorischer Kohlenstoffoxidaionszyklus bzw. C2-Zyklus; 2-Phosphoglykolat Stoffwechsel; Lorimer und Andrews, 1981) wird auf Grund der Bifunktionalität der Rubisco (Ribulose-1,5-bis-Phosphat-Carboxylase-Oxygenase) notwendig. Dieses mengenmäßig häufigste Enzym der Welt initiiert als Carboxylase die CO<sub>2</sub>-Fixierung im Calvin-Benson-Zyklus in allen oxygenen Phototrophen. Weiterhin kann es bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff als Oxygenase wirken, was die Entstehung von 2-Phosphoglykolat (2-PG) zur Folge hat (Bowes et al., 1971). Das 2-PG kann nicht weiter im Calvin-Zyklus verstoffwechselt werden und inhibiert einige der daran beteiligten Enzyme. Um den Verlust an gebundenem Kohlenstoff in Pflanzen zu minimieren und diesen Giftstoff zu entfernen, werden zwei Moleküle von 2-PG im C2-Zyklus zu einem Molekül 3-Phosphoglyarat (3-PGA) metabolisiert. Durch den C2-Zyklus werden 75 % des organischen Kohlenstoffs von 2-PG zu 3-PGA umgesetzt, während 25 % als CO<sub>2</sub> freigesetzt werden. Zusätzlich verbraucht dieser Zyklus ATP

und Reduktionsmittel und es wird  $\text{NH}_3$  freigesetzt. Durch den Gaswechsel des C2-Zyklus, bei dem  $\text{O}_2$  verbraucht und  $\text{CO}_2$  freigesetzt wird, bezeichnet man diesen Stoffwechselweg in Anlehnung an die mitochondriale Respiration als „Lichtatmung“ bzw. Photorespiration. Dass die Photorespiration eine wichtige Rolle sowohl in Cyanobakterien (Eisenhut et al., 2008) als auch bei deren Anpassung bei hoher Lichteinstrahlung spielt (Hihara et al., 2001; Hackenberg et al., 2009), wurde bereits nachgewiesen.

Inwieweit Photorespiration als Anpassungsstrategie an die Extrembedingungen in einer Cyanobakterien-Blüte fungiert, wurde jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht untersucht.

Extrembedingungen umfassen hierbei eine hohe Starklichteinstrahlung von bis zu  $1900 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  (Mohlin und Wulff, 2009) sowie die hohe Sauerstoffkonzentration durch photosynthetische Prozesse während des Spätsommers im Vergleich zum Frühjahr (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Photorespiration als mögliche Anpassungsstrategie.** Im Frühling herrscht ein proportionales  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Verhältnis vor, die Lichtenergie der Sonne kann gut in die Wassersäule eindringen. Im Spätsommer bilden sich hohe Sauerstoffkonzentrationen und extremes Starklicht, was zur Bildung von ROS führt. Durch die Bildung einer Oberflächenblüte kann keine Lichtenergie in die Wassersäule eindringen und verhindert damit ein Leben photosynthetisch-aktiver Organismen.

### 1.7 *Nodularia spumigena*

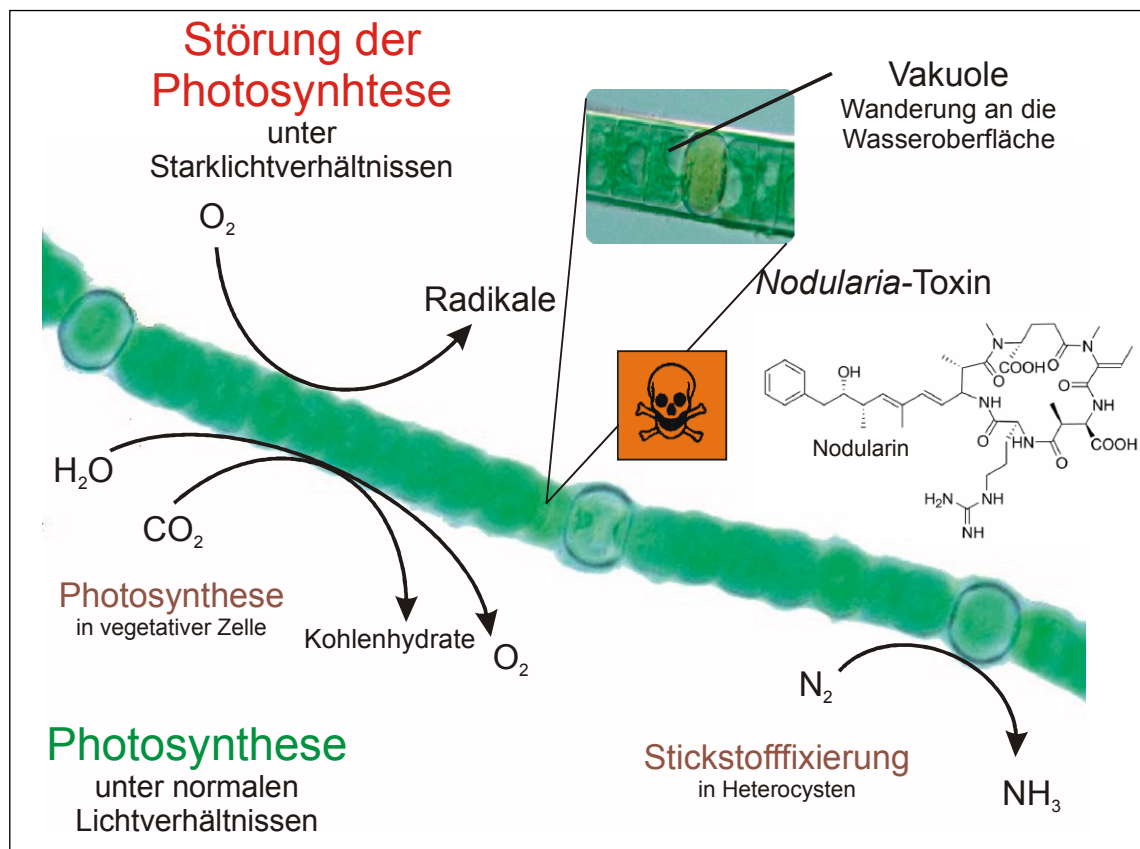
*Nodularia spumigena* (Nostocales, Nostocaceae) ist ein planktisches Cyanobakterium. Seine Zellen sind in fädigen Zellverbänden (Coenobien) mit weit über 100 Einzelorganismen organisiert, von denen einige unter Stickstoffmangel zu Heterocysten differenzieren und N<sub>2</sub>-Fixierung betreiben können (Wasmund, 1997; Sivonen et al., 2007). Zusätzlich besitzt es Vakuolen zur Steuerung der vertikalen Positionierung in der Wassersäule (Abbildung 3). Dieses Cyanobakterium kommt in Süßwasser und in Brackwasser von bis zu 30 ‰ Salzgehalt vor und bildet eine Vielzahl an bioaktiven Substanzen. Es scheint kosmopolitisch, d.h. weltweit verbreitet zu sein. Im Spätsommer, wenn die Wassertemperatur mindestens 17 °C beträgt und sich eine stabile Schichtung im Wasserkörper eingestellt hat, sind *Nodularia*-Massenentwicklungen an der Wasseroberfläche, die sogenannten Cyanobakterien- oder Blaualgenblüten in den zentralen und Küstenregionen der Ostsee ein verbreitet auftretendes Phänomen. Die Blütenbildung von *N. spumigena* und die des eng verwandten Stammes *Aphanizomenon* spp. ist stark abhängig von einer stabilen Schichtung der Wassersäule (z.B. Stal und Walsby, 2000). Ploug konnte (2011) zeigen, dass blühende *Nodularia*-Kolonien große Mengen an Ammoniak produzieren und der mikrobiellen Gemeinschaft zur Verfügung stellen. *Nodularia*-Stämme aus der Ostsee zeichnen sich durch eine hohe Vielzahl bioaktiver Verbindungen, einschließlich des Toxins Nodularin aus, welches teilweise das hohe Aufkommen dieser blütenbildenden Stämme erklärt (z.B. Fewer et al., 2009).

Alle Blüten entwickelten sich bei anhaltend schönem Wetter und ruhiger See. Vergiftungen durch *Nodularia* ereignen sich meist im August, nachdem die Cyanobakterienmassen durch leichten Winddruck an den Strand gespült wurden. Vergiftungen durch die Aufnahme von stark mit *N. spumigena* angereicherten Wasserkörpern sind schon mehrmals als Todesursache von Warmblütern beschrieben worden. Francis berichtet bereits (1878) über den Vergiftungstod von Schafen, Pferden, Hunden und Schweinen durch eine Blüte von *N. spumigena* in Australien. In Europa sind erst in den letzten Jahrzehnten (erstmalig 1963) toxische *Nodularia*-Blüten vor allem aus dem Gebiet der Ostsee beschrieben worden.

*Nodularia*-Stämme wurden in Küstengewässern mit unterschiedlichen Salzgehalten gefunden (siehe Liste von *Nodularia*-Isolaten in Lyra et al., 2005), in Flussmündungen (Huber, 1984), aber auch in von Salzeinfluss betroffenen Binnengewässern (Dorador et al., 2008) sowie vereinzelt im Meerwasser (Pushparaj et al., 1995). Die Gattung *Nodularia* umfasst verschiedene Arten mit unterschiedlichen ökologischen

Spezialisierungen (Moffitt et al., 2001; Lyra et al., 2005). Die Anpassung an verschiedene Salinitäten ist eine Grundvoraussetzung für das Leben in der Ostsee, da dieses Brackgewässer durch einen Salzgradienten charakterisiert ist.

Das Vorkommen sehr großflächiger Blüten lässt vermuten, dass *Nodularia* in einem großen Salzbereich optimal wächst (siehe Abbildung 1). Bei der Betrachtung des Satellitenbildes mit der Verteilung der Salinität in der Ostsee, ist ein Vorkommen der Blüte in Bereichen von 8 – 15 PSU (Practical Salinity Units) zu vermuten.



**Abbildung 3:** *Nodularia spumigena* ist ein fadenförmiges Cyanobakterium mit Heterocysten zur Stickstofffixierung und Gasvakuolen zur Bewegung in der Wassersäule. *Nodularia*-Stämme produzieren das hepatotoxische Nodularin.

### 1.8 *Nodularia spumigena* CCY9414

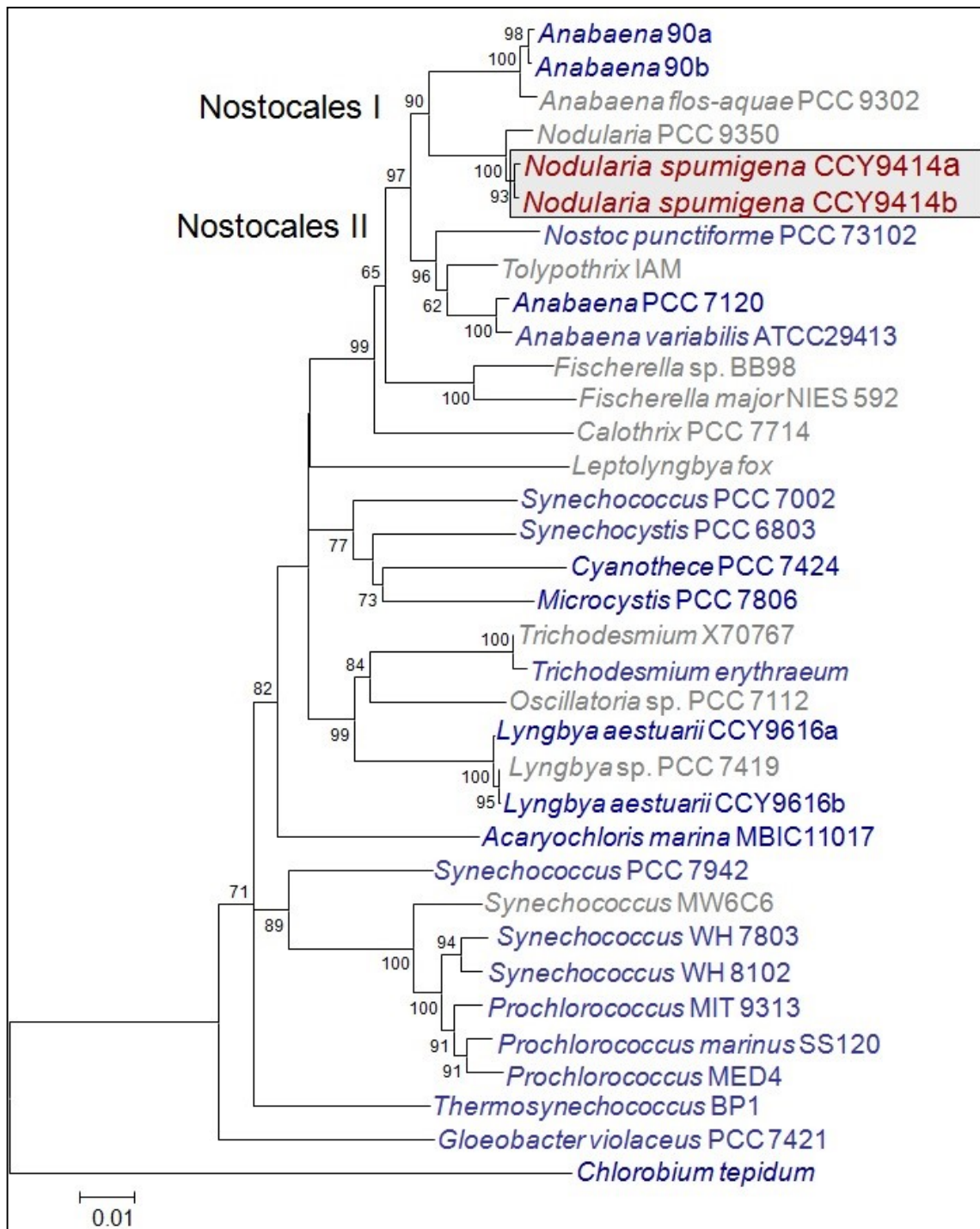
In den letzten Jahren wurde eine zunehmende Anzahl von cyanobakteriellen Genomsequenzen in Datenbanken zugänglich (z.B. Cyanobase: <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>). Diese Genomsequenzen spielen eine wichtige Rolle bei der Aufklärung molekularer Stressanpassungen sowie evolutionärer Prozesse und Verwandtschaftsbeziehungen.



Traditionelle Feldstudien bestehen in der Sammlung von Daten. Diese werden in mathematischen Modellen miteinander verrechnet, um Zusammenhänge aufzudecken (z.B. Huber et al., 2012). Mit zunehmendem Wissen zur Physiologie von Cyanobakterien, den vorhandenen Genomsequenzen sowie neuen Methoden (z.B. Next Generation Sequencing) ist es möglich, nicht nur vermehrt Daten an Cyanobakterien im Labor zu ermitteln, sondern diese im Freiland direkt zu untersuchen. So kann der molekulare Zustand der Cyanobakterienzelle als Sonde dienen, um das Ökosystem direkt zu charakterisieren. Zum Beispiel kann das Expressionsverhalten einzelner Gene mittels reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) aber auch vieler Gene in meta-transkriptomischen Analysen durch RNAseq (Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung, erstmals erwähnt in Morin et al., 2008) einer mikrobiellen Population untersucht und aus der Expression bestimmter Gene auf die Umwelt geschlossen werden. Erste Anwendungen von RNAseq sind bei Modellstämmen nach Laborkultivierung (Ludwig und Bryant, 2011; Mitschke et al., 2011 a, b) und auch an Ozeanproben mit *Trichodesmium* und *Crocospaera* (Hewson et al., 2009 a, b) publiziert worden.

Seit kurzem ist die Genomsequenz des toxischen Ostseeisolates *Nodularia spumigena* CCY9414 (ab hier *Nodularia* CCY9414) fast vollständig aufgeklärt, sodass detaillierte Untersuchungen der Blütenbildung auf molekularer Ebene möglich sind. Der Stamm wurde von der Wasseroberfläche nahe Bornholm im Jahre 1994 isoliert. Fast das gesamte Genom (98 %) ist momentan zugänglich und wird derzeit von den Arbeitsgruppen von L. J. Stal, Yerseke, Niederlande und W. R. Hess, Freiburg, Deutschland vervollständigt.

Das *Nodularia* CCY9414 Draft-Genom umfasst 5.462.371 Nukleotide, welche für 5.294 Proteine codieren (Voß et al., 2013). Der auf 16S rRNA basierende phylogenetische Stammbaum zeigt, dass fädige Cyanobakterien mit Heterocysten in zwei Sektionen innerhalb der Nostocales aufspalten (Abbildung 4). Der Ast Nostocales II umfasst die gut untersuchten Arten *Anabaena* PCC 7120, *Nostoc punctiforme* PCC 73102 und *A. variabilis* ATCC 29133. Dagegen clustert *N. spumigena* CCY9414 zusammen mit *Anabaena* sp. 90, einem weiteren Ostseestamm, dessen Genom kürzlich publiziert wurde (Wang et al., 2012), innerhalb der Nostocales I. Somit ist dieses Isolat repräsentativ für eine Vielzahl an blütenbildenden, filamentösen, diazotrophen Cyanobakterien, welche Einfluss auf ihr umliegendes Ökosystem nehmen.



**Abbildung 4: 16S rRNA Stammbaum.** Phylogenetische Positionierung von *N. spumigena* CCY9414 (eingerahmt) innerhalb von Cyanobakterienstämmen mit bekannten Genomsequenzen. Dabei ist eine enge Clusterung mit anderen filamentösen, stickstofffixierenden Cyanobakterien ersichtlich (Abbildung aus Voß et al., 2013).

## 1.9 Zielstellung der Arbeit

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es nur wenige molekularbiologische Arbeiten mit Cyanobakterien, die zur Ausbildung einer Algenblüte befähigt sind. Daher sind molekulare Mechanismen für das Auftreten dieses Phänomens wenig bekannt. Um eine Oberflächenblüte auszubilden, müssen diese oxygenen phototrophen Lebewesen befähigt sein, sich an extreme Umweltbedingungen anzupassen. Diese Aspekte konnten bisher nur thesenhaft durch die Messung äußerer Parameter erklärt werden.

Mit *Nodularia* CCY9414, einem Stamm der Ostsee-Spätsommerblüte mit sequenziertem Genom, war es nun erstmals möglich, molekulare Anpassungsstrategien an einzelnen Faktoren der Blütenbildung (Salinität, Nährstoffverfügbarkeit, Starklicht und hohe Sauerstoffkonzentrationen) zu untersuchen. Folgende Aspekte standen im Mittelpunkt meiner Untersuchungen:

Nutzt *Nodularia* CCY9414 die gleichen Proteine zur Stressanpassung wie die Modellorganismen *Synechocystis* sp. 6803 oder *Anabaena* sp. 7120, bei denen deren Funktion bereits unter verschiedenen abiotischen Faktoren charakterisiert ist?

Welche Möglichkeiten besitzt *Nodularia* CCY9414, um sich im Salzgradienten der Ostsee zu etablieren?

Kommt es bei hohen Lichtintensitäten und Sauerstoffkonzentrationen zu Veränderungen im globalen Genexpressionsmuster und sind evtl. *Nodularia* CCY9414 spezifische Gene an dieser Stressanpassung beteiligt?

Welche molekularen Mechanismen könnten erklären, dass es trotz Mangel an freien  $P_i$ -Quellen zum massenhaften Auftreten einer von *Nodularia*-Arten dominierten Blüte kommt?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeines

Alle in der Dissertation verwendeten Chemikalien entsprachen einem analytischen Reinheitsgrad. Während der Arbeit mit Bakterienkulturen wurde auf eine sterile Umgebung geachtet und, soweit es möglich war, eine Sterilbank verwendet. Dies beinhaltet die Verwendung von ausschließlich sterilen Pipettenspitzen, autoklavierten oder steril filtrierten Chemikalien und sterilen Gefäßen. Sofern nicht anders aufgeführt, wurde ausschließlich doppelt destilliertes Wasser verwendet.

### 2.2 Materialien

#### 2.2.1 Organismen

Der in dieser Arbeit verwendete Organismus *Nodularia* CCY9414 wurde in der Einleitung ausführlich beschrieben.

#### 2.2.2 Klonierungsstamm

Der Stamm DH5 $\alpha$  wurde zur Klonierung benutzt, da dieser Klonierungsstamm eine hohe Transformationseffizienz besitzt.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , $\Delta$ <i>lacZM15</i> , <i>hsdR17</i>	Laborsammlung

#### 2.2.3 Chemikalien und Puffer

Verwendete Chemikalien und Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Fermentas, New England Biolabs, Qiagen, Roth und Sigma bezogen.

#### 2.2.4 Enzyme

##### Reverse Transkriptase

Zur Synthese von cDNA aus RNA wird die reverse Transkriptase benötigt. Die Methode der reversen Transkription ist hochempfindlich und deswegen gut geeignet,

um die Genexpression auf RNA-Ebene zu untersuchen. Mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern, die an die Poly(A)-Struktur der einzelsträngigen mRNA hybridisieren, kann die reverse Transkriptase komplementäre cDNA synthetisieren. Die in dieser Arbeit verwendete reverse Transkriptase stammt aus dem *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMuLV reverse Transkriptase). (MBI FERMENTAS).

### Taq-Polymerase

Die Taq-Polymerase ist eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976). Das Enzym hat ein Temperaturoptimum bei 75 °C und besitzt sowohl eine 5'-3'-DNA-Polymerase- als auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Die Taq-Polymerase kann Adenosin-Überhänge am 3'-Ende der Amplifikate erzeugen. Sie wird zur schnellen und einfachen Vervielfältigung von DNA-Molekülen verwendet.

(Quelle: Laborpräparat, rekombinant aus *E. coli*)

#### 2.2.5 Marker und Standards

100 bp DNA Ladder (FERMENTAS)

1kb Ladder (FERMENTAS)

*EcoRI*/ *HindIII* Ladder (FERMENTAS)

#### 2.2.6 Oligonukleotide/Primer

In der Tabelle I (siehe Anhang) sind die verwendeten Oligonukleotide für Sequenzierungen und Klonierungen zusammengefasst. Die Oligonukleotide wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und in einer Stammlösung von 100 pmol/µl bei -20 °C gelagert. Für die Amplifikation mittels PCR wurden diese in einer Konzentration von 5 pmol/µl Lösung eingesetzt.

#### 2.2.7 Vektorsysteme

Vektor	Größe (bp)	Relevante Merkmale	Herkunft
pGemT®	3000	P <sub>T7</sub> , <i>lacZ</i> start codon, <i>lac</i> operon, Amp <sup>R</sup> , linearisiert über <i>EcoRV</i> , 3'-term. T-Überhang	PROMEGA

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1.1 PCR als Nachweismethode für Insertionsmutationen

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987), lassen sich spezifische DNA-Sequenzen amplifizieren. Zwei definierte Oligonukleotide (sense/antisense Primer), welche zu jeweils einem Strang der DNA-Doppelhelix komplementär sind, agieren als Startermoleküle und stellen somit Ausgangspunkte für die PCR dar. Um die Reaktion zu ermöglichen, müssen ausreichende Mengen der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) sowie eine thermostabile DNA-Polymerase - in diesem Fall die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* vorhanden sein.

Reaktionsansatz PCR (20 µl):

6	µl	H <sub>2</sub> O
1	µl	Primer (sense)
1	µl	Primer (antisense)
2	µl	DNA bzw. cDNA
10	µl	Master Mix

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbarer Deckplatte (TPersonal, Biometra GmbH, Göttingen). Ein typisches PCR-Protokoll war folgendermaßen aufgebaut: Der erste Schritt des Programmes beinhaltete die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 5 min. Danach wurden 30mal (Zykluszahl variierte je nach Gen) die folgenden Schritte wiederholt: 1 min bei 94 °C (Denaturierung), 1 min bei 52 °C (Anlagerung der Starter-Oligonukleotide), 1 min bei 72 °C (Polymerisation). Am Ende dieser Wiederholungen wurde für weitere 5 min bei 72 °C die finale Polymerisation eingeleitet, bei der die Verlängerung von Abbruchfragmenten stattfand.

#### 2.3.1.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld. Die negativ geladenen Moleküle werden auf Grund ihrer Größe voneinander getrennt - je kleiner das Molekül, desto schneller wandert dieses durch das Gel.

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde 1%iges Agarosegel hergestellt. Das Gel wurde mit Laufpuffer (1x TBE) gegossen und mit einer Ethidiumbromidstammlösung (1:10000) versetzt. Dieser interkalierende Farbstoff bildet mit der DNA einen Komplex, der mittels UV-Licht zum Leuchten gebracht werden kann. Dadurch wird die DNA auf einem Transilluminator sichtbar und kann fotodokumentarisch festgehalten werden.

#### **2.3.1.3 DNA-Elution aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der Nucleospin® Extract Kit (Machery-Nagel) verwendet. Die DNA wurde aus dem Agarosegel unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Alle weiteren Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

#### **2.3.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten**

Für die Klonierung der amplifizierten Gene wurde das pGemT-Kit (Promega) verwendet. Dieser Vektor besitzt eine Multiple Klonierungsstelle in einer für  $\beta$ -Galaktosidase kodierenden Region, wodurch die sogenannte Blau-Weiß-Selektion möglich ist (siehe 2.3.1.7). Die Klonierung erfolgte nach Herstellerangaben.

#### **2.3.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten**

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Ligation für die Insertion von DNA-Fragmenten in Plasmide eingesetzt. Um eine möglichst hohe Ligationsrate zu erzielen, wurden die zu ligierenden DNA-Fragmente in einem molaren Verhältnis von 1:1 der Reaktion zugegeben. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes wurde mit 10-20  $\mu$ l möglichst klein gehalten, um eine optimale Transformationsrate zu erlangen. Zusätzlich zur DNA wurde die T4-Ligase im entsprechenden Ligationspuffer sowie A. dest. verwendet. Der fertige Ansatz wurde im Kühlschrank über Nacht inkubiert. Für einen 20  $\mu$ l-Ligationsansatz hatte die Reaktion folgende Zusammensetzung:

x  $\mu$ l Vektor-DNA  
x  $\mu$ l DNA  
1  $\mu$ l 10 x Ligationspuffer  
1  $\mu$ l Ligase  
→ auf 10  $\mu$ l mit A. dest. auffüllen

### **2.3.1.6 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA**

Die Messung der Konzentration der wässrigen RNA- bzw. DNA-Lösung erfolgte mittels photometrischer Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm. Dabei entspricht eine Absorption von 1,0 bei 260 nm etwa einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA (Warburg und Christian, 1942). Für die Messungen wurden 1-2 µl der RNA- bzw. DNA-Lösung mit dem Nano-Drop2000 der Firma Thermo Scientific vermessen.

### **2.3.1.7 Blau-Weiß-Selektion**

Bakterien, welche einen zur Blau-Weiß-Selektion fähigen Vektor (z.B. pCR2.1) enthalten, sind Ampicillin resistent, da der Vektor ein ampR-Gen enthält und besitzen überdies eine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase. Diese Bakterien bzw. deren  $\beta$ -Galaktosidase setzt X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) enzymatisch um und bildet Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol, durch den die Kolonien blau erscheinen. Der Einbau eines Fragmentes in die MCS (multiple cloning site, liegt im lacZ-Gen) zerstört das Leseraster des lacZ-Gens. Es kann keine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase mehr gebildet werden, sodass die betreffenden Bakterien-Kolonien in Gegenwart von X-Gal farblos (weiß) bleiben. IPTG (Isopropylthio-galaktosid) dient als Induktor für die  $\beta$ -Galaktosidase, wird jedoch nicht durch diese zersetzt. Dies bedeutet, dass auf entsprechenden Nährböden nur diejenigen Bakterien Kolonien bilden können, welche auch durch die Transformation ein ampR-Gen erhielten. Sind die Zellkolonien durch X-Gal blau gefärbt, ist die  $\beta$ -Galaktosidase noch funktionsfähig, d. h. es wurde bei der Ligation keine Fremd-DNA in den Vektor eingebaut. Sind die Zellkolonien nicht gefärbt, so ist die  $\beta$ -Galaktosidase nicht funktionsfähig, d. h. es wurde Fremd-DNA in den Vektor eingebaut und dadurch das Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase zerstört.

### **2.3.1.8 Sequenzierungen**

Für die DNA-Sequenzierung wurde das enzymatische Kettenabbruchverfahren bzw. Didesoxyverfahren nach Sanger angewendet (Sanger et al., 1977), welches auf der enzymatisch katalysierten Synthese einer Population von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten basiert. Diese Fragmente können nach ihrer Größe in einem



denaturierenden Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Aus dem entstehenden Bandenmuster lässt sich die DNA/RNA-Sequenz rekonstruieren.

Die Sequenzierungsarbeiten für die 16s rRNA-Stammbäume wurden bei der Firma LGC Genomics in Auftrag gegeben.

#### **2.3.1.9 RNA- Isolation**

Die Isolation erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® RNA Plant Kit von MACHEREY-NAGEL gemäß des mitgelieferten Protokolls. Die isolierte RNA wurde mittels Elektrophorese überprüft und danach zur cDNA-Synthese verwendet.

#### **2.3.1.10 cDNA-Synthese**

Für Expressionsanalysen von Genen mittels RT-PCR wird cDNA als Template benötigt. Die cDNA wird durch die virale Reverse Transkriptase synthetisiert, wobei RNA als Matrize dient.

Die cDNA-Synthese wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit von FERMENTAS nach Angaben des beiliegenden Protokolls durchgeführt. Dazu wurden 2,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Im Vorfeld wurde die Konzentration der RNA bestimmt und die entsprechende Menge in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Gegebenenfalls wurde die RNA noch mit Hilfe der Con 1000 Speed Vac der Firma FRÖBEL eingeengt, da für die cDNA-Synthese-Reaktion ein Reaktionsansatz von 20 µl vorgeschrieben ist.

Für die Erststrang-Synthese wurden 1 µl Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl) zu maximal 12 µl RNA-Lösung pipettiert, sodass der Ansatz ein Gesamtvolumen von 13 µl besitzt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 70 °C wurde das Gemisch sofort auf Eis gestellt und mit 4,0 µl 5x Erststrangpuffer und 2,0 µl 10 mM dNTP-Mix versehen. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl M-MuLV6 Reverse Transkriptase verblieben die Proben für 60 min bei 42 °C. Durch die Inkubation der Proben bei 70 °C für 10 Minuten wurde die Reaktion abgestoppt. Die so hergestellte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.3.2 Kultivierung

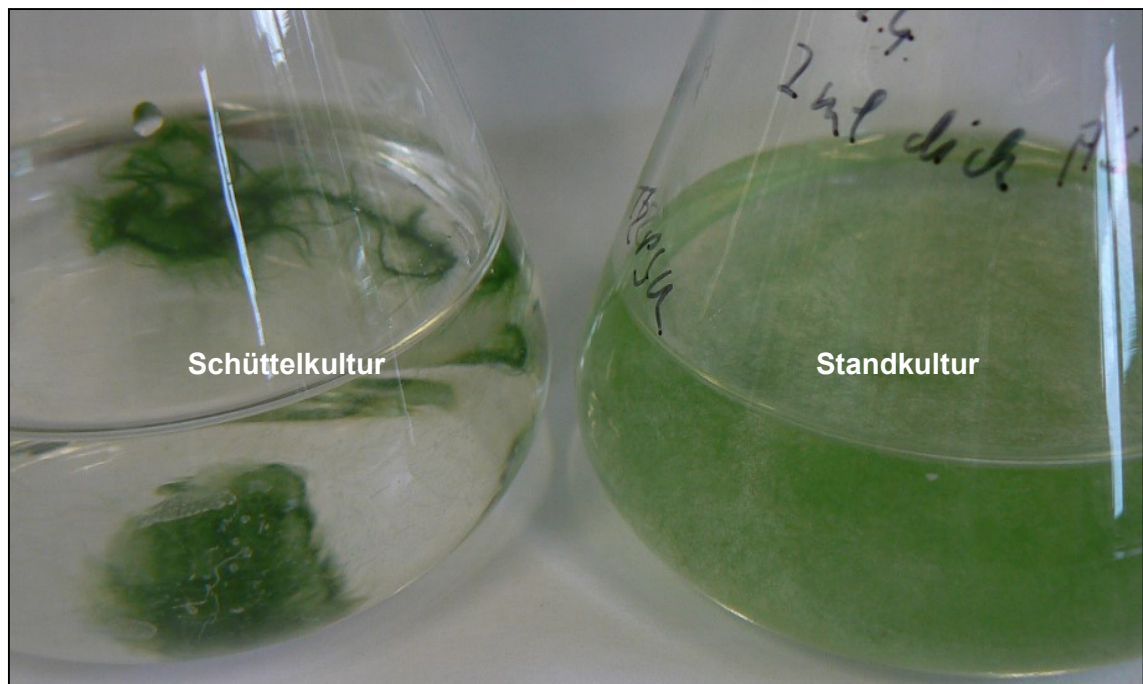
#### 2.3.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

*E. coli* wurde, wenn nicht anders vermerkt in Antibiotika-haltigem LB-Medium (3.1.5) bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum in Flüssigkulturen erfolgte auf einem Rotationsschüttler bei 180 rpm in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben mit Schikanen, die maximal mit  $\frac{1}{3}$  des nominellen Volumens gefüllt waren. Die Kultivierung auf LB-Agarplatten erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C.

#### 2.3.2.2 Kultivierung von *Nodularia* CCY9414

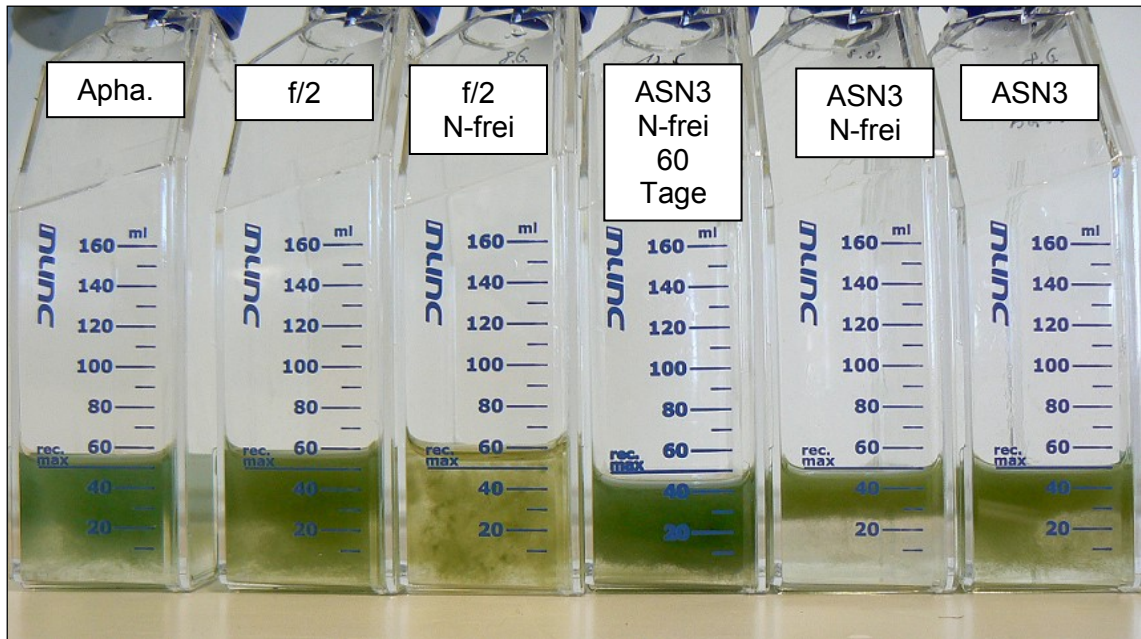
Erste Schritte zur Kultivierung von *Nodularia* CCY9414 bestanden darin, aus der Literatur bekannte Bedingungen an unsere technischen Möglichkeiten hin zu adaptieren. Es konnte ermittelt werden, dass *Nodularia* CCY9414 bei etwa 10 PSU und ca. 19 °C optimal wächst. Diese Bedingungen kommen auch dem natürlichen Optimum nahe (Ort der Probenahme des Isolats in der Nähe zu Bornholm).

Darüber hinaus ergaben erste Tests zur Kultivierung, dass kontinuierliches Schütteln die Filamente aggregieren lässt und diese dann nicht mehr homogen in der Suspension vorliegen (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Vergleich der Beschaffenheit von *Nodularia* CCY9414 in Schüttelkulturen und Standkulturen.** Kultivierung unter permanentem Schütteln im linken Kolben (Schüttelkultur) führt zur Aggregation der Filamente. Die Standkultivierung (rechter Kolben) bewirkt eine homogen erscheinende Zellsuspension.

Ein weiteres Problem stellte die Anheftung der Zellen an die Glaswand der Kolben dar. Durch die Kultivierung in Zellkulturflaschen, EasYflask mit Filterkappen, der Firma Nunc konnte dieses Problem gelöst (Abbildung 6) und zusätzlich durch den Filterdeckel der Gasaustausch ermöglicht werden.



**Abbildung 6: Medienvergleich.** Testung verschiedener in der Literatur beschriebener Medien zur Kultivierung von *Nodularia* CCY9414. Apha. – Medium für *Aphanizomenon* Z8 (Kotai, 1972), f/2 – Medium auf Basis von filtriertem Ostseewasser (Guillard und Ryther, 1962), ASN3 – Medium für filamentöse Cyanobakterien.

Abbildung 6 zeigt das Ergebnis einer einmonatigen Kultivierung in Gewebekulturflaschen, wobei *Nodularia* CCY9414 in verschiedenen Medien angezogen wurde. Das beste Wachstum sowohl bei einer Kultivierung in N-freien als auch Nitrat-haltigen Medien wurde mit ASN3 beobachtet. Gegenüber den anderen getesteten Medien bietet ASN3 zusätzlich den Vorteil, dass auf Grund seiner festgelegten Zusammensetzung, definiert verschiedenste Anzuchtbedingungen realisiert werden können. Um die Möglichkeit der Spontanmutation des Stickstofffixierers auszuschließen, erfolgte die weitere Erhaltung von *Nodularia* CCY9414 in Nitrat-freiem ASN3 Medium.

Nach diesen Vorversuchen wurden für die Anzucht von *Nodularia* CCY9414 folgende Standardbedingungen gewählt. Als Medium wurde ASN3 (Rippka et al., 1979) verwendet (Zusammensetzung; siehe Anhang Tabelle II). In 500 ml Zellkulturflaschen wurden 200 ml Medium eingefüllt und mit 5 ml einer Ausgangskultur beimpft. Die Zellsuspension wurde einmal täglich gemischt. Die Kultivierung erfolgte im Percival-

Inkubationsschrank bei ca.  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16/8 h, wie er im Sommer vorkommt (Musial und Plinski, 2003).

### **2.3.3 Untersuchungsprotokoll**

Um unterschiedliche Parameter untersuchen zu können, musste die Voraussetzung geschaffen werden, mit einem Standardprotokoll zu arbeiten bzw. Proben zu nehmen. Durch aufwendige Vorversuche wurden Volumina ermittelt, welche eine Detektion der jeweiligen Untersuchungsparameter ermöglichen.

Wie schon ausführlich in der Einleitung beschrieben, ist *Nodularia* CCY9414 filamentös und besitzt Gasvakuolen. Auf Grund dieser Eigenschaften bildet sich bei der Kultivierung keine homogene Suspension und die Gasvakuolen machen Zentrifugationsschritte, wie sie für Protokolle von Standardmodellorganismen üblich sind, unmöglich. Somit erfolgte die Beprobung und Konzentrierung der Biomasse mittels Vakuumfiltration auf Filtern. Als Standardfilter wurden Glasfaser-Mikrofilter der Firma Whatman verwendet (Glasfaser-Mikrofilter GF/F Ø 24 mm, Dicke: 0,42 mm).

Nach der Filtration wurden die Probenfilter in einem Eppendorfgefäß in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.3.4 In silico-Analysen**

Mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) wurden Sequenzdatenbanken nach zur eingegebenen Sequenz ähnlichen Sequenzen durchsucht (Altschul et al., 1990). BLASTn wird allgemein zum direkten Vergleich einer Nukleotid-Sequenz mit einer Nukleotiddatenbank verwendet.

tBLASTn vergleicht eine Proteinsequenz mit einer Nukleotiddatenbank, indem eine Übersetzung aller möglichen Leseraster der Nukleotid-Sequenzdatenbank benutzt wird. BLASTp durchmustert eine Proteindatenbank mit einer Proteinsequenz als Suchvorgabe. Mit Hilfe von PSI-BLAST (Position Sensitive Iterative BLAST) kann eine Suche nach verwandten Sequenzen mit geringer Sequenzidentität in einer Proteindatenbank durchgeführt werden. Nach einer klassischen BLASTp-Suche wird ein Sequenzalignment der erhaltenen Treffer in der Datenbank erstellt. Aus allen erhaltenen Sequenzen wird eine neue Suchsequenz zusammengestellt, bei der die Konservierung bestimmter Positionen zwischen den erhaltenen Sequenzen in eine Gewichtung einfließt. Interaktiv schließen sich mehrere BLASTp-Suchen mit der jeweils

um neu erhaltene Sequenzen erweiterte und neu berechnete Konsensussequenz an, bis keine neuen Treffer mehr erzielt werden. BLAST-Suchen (Analysen) wurden über die Internetseiten des National Center for Biology Information (NCBI) (URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) und der EnsemblDatenbank (URL: [www.ensembl.org/Multi/blastview](http://www.ensembl.org/Multi/blastview)) durchgeführt.

### **2.3.5 RNA-Seq (Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung)**

Die RNA-Sequenzierung stellt eine quantitative Hochdurchsatzmethode dar, welche die Expression von Abschnitten eines Genoms analysiert. Hierzu wurde erst die RNA in cDNA übersetzt und dann einer darauf folgenden Sequenzierung zur Nukleotidbestimmung unterzogen. Mit Hilfe der *Next-Generation Sequencing* Methoden ist es möglich, die Expression einzelner Allele eines gesamten Genoms zu quantifizieren. Diese Methodik wurde erstmals von Morin et al. (2008) als „Whole Transcriptome Shotgun Sequencing“ (WTSS) beschrieben. Die Quantifizierung der erhaltenen Sequenzen erfolgt über das Zählen der contigs, ein Set überlappender DNA-Stücke die von derselben genetischen Quelle stammen, nach der Annotation zum vorhandenen Genom von *Nodularia* CCY9414. Durchgeführt wurden diese Arbeiten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Hess aus Freiburg. Mit Hilfe eines Genombrowsers und dem Annotationstool „Artemis“ kann eine graphische Auswertung über mögliche Transkriptionsstartpunkte (TSS; transcriptional start sites) erfolgen. Das Programm steht zum freien Download zur Verfügung: <http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis>.

### **2.3.6 Wachstumsfluometrie**

Es wurde die von Karsten et al. (1996) und Gustavs et al. (2009) beschriebene Methodik für Cyanobakterien getestet. Das Gerät wurde von der Arbeitsgruppe Experimentelle Ökologie (Rostock) zur Verfügung gestellt und nach Anleitung benutzt.

### **2.3.7 Trockenmassenbestimmung**

Die Trockenmassen wurden auf Glasfaserfiltern GF/F (Whatman) nach Trocknung über Nacht bei 105 °C bestimmt. Vor Benutzung wurde den Filtern mittels Exsikkator die Restfeuchtigkeit entzogen.

### 2.3.8 Chlorophyllbestimmung

Die Bestimmung der Chlorophyll (Chl) *a*- und *b*-Gehalte erfolgte nach der Methode von Porra et al. (2002). Das Probematerial wurde in einer definierten Menge über einen Filter gezogen, in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die schrittweise Homogenisation erfolgte in 1 ml 80%igem Aceton über einen Zeitraum von 2 Stunden. Anschließend wurde ein Zentrifugationsschritt bei 2500 x g für 10 Minuten, bei 4 °C durchgeführt. Der resultierende Überstand diente zur Messung eines diskontinuierlichen Spektrums (480, 646, 647, 654, 663, 664 und 750 nm). Die Berechnung der Chlorophyllgehalte erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}) = 12,25 \times (\text{E663}-\text{E750}) - 2,55 \times (\text{E674}-\text{E750})$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}) = 20,31 \times (\text{E647}-\text{E750}) - 4,91 \times (\text{E663}-\text{E750})$$

$$\text{Chl a + b } (\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}) = 17,76 \times (\text{E647}-\text{E750}) - 7,34 \times (\text{E663}-\text{E750})$$

### 2.3.9 Gaschromatographie

Der Begriff Chromatographie kann als Trennmethode definiert werden, bei der eine gelöste Substanzmischung mit Hilfe eines Gas- oder Flüssigkeitsstromes über eine stationäre Phase geleitet und dabei in die einzelnen Bestandteile der Mischung aufgetrennt wird.

Die Gaschromatographie (GC) ist eine sehr empfindliche Methode, mit der sich Gase und flüchtige Substanzen bestimmen lassen. Das Prinzip beruht darauf, dass ein inertes Trägergas durch eine thermostatisierte Säule strömt und die zu analysierenden Substanzen im Gasstrom detektiert werden. Als Trägergas wurde Stickstoff verwendet. Die Säulen sind entweder mit feinkörnigem Trägermaterial gefüllt, z.B. auf der Basis von Aluminium- oder Siliciumoxid, oder sie sind innen z.B. mit Wachsen oder Kunststoffen beschichtet. Die Detektion erfolgt durch die Messung der Flammenionisation.

### **Probenvorbereitung für die GC**

Hier wurde ein etabliertes Protokoll unserer Arbeitsgruppe für *Nodularia* CCY9414 leicht abgewandelt.

Zur Messung des Gehaltes interner Osmolyte wurden 10 ml Probenmaterial über einen Filter (Whatman) gezogen und in einem Eppendorfgefäß mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Proben wurden durch Zugabe von 1 ml 80 % HPLC-Aceton präzipitiert. Zu jeder Probe erfolgte eine Zugabe von 50 µg Sorbitol, der in diesem Fall als interner Standard fungierte und quantitative Analysen ermöglichte. Es erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 68 °C. Nach einem Zentrifugationsschritt (20.000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und gefriergetrocknet. Das trockene Probenmaterial wurde mit 500 µl HPLC-H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit dem Wasser auf einem Schüttler, erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (unter gleichen Bedingungen) um anschließend den Überstand in ein neues Eppendorfgefäß zu überführen. Auch dieser Überstand wurde gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Probenmaterial stand der Derivatisierung und der Untersuchung mittels GC zur Verfügung.

### **Probenderivatisierung**

Zur Derivatisierung wurden die Proben in Pyridin/Methoxylamin-Gemisch (20 mg Methoxylamin in 1 ml Pyridin lösen) aufgenommen (Abzug!) und anschließend gemischt. Eine Inkubation erfolgte für 90 min bei 30 °C auf einem Schüttler. Dabei bewirkte O-Methoxylamin, dass die offenkettige Struktur der Kohlenhydrate stabilisiert wurde. Diese Stabilisierung war notwendig, damit alle Hydroxylgruppen bei der anschließenden Behandlung mit 35 µl MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluor-Acetamid); für 90 Min bei 65 °C für die Silylierung zugänglich waren. Anschließend erfolgte eine Analyse der Proben durch einen Gaschromatographen (FOCUS GC Model AS 3000 der Firma Thermo Scientific, Dreieich). Zur Auftrennung wurde eine Kapillarsäule des Types TR-5MS (30 m Länge, 0,25 mm ID, 0,25 µm Film der Firma Thermo Scientific, Dreieich) verwendet, wobei als Trägergas Stickstoff fungierte.

### 2.3.10 Aminosäureanalysen mittels HPLC

Die Methode der „High-Pressure-Liquid-Chromatography“ (HPLC, Shimadzu) diente in diesem Fall der Bestimmung von Glycin und Serin sowie von Glutamat in unterschiedlichen Versuchen. Zur Beprobung wurden Kulturen auf einem Filter (Whatman) gezogen und sofort in flüssigem Stickstoff in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß eingefroren. Im Anschluss daran erfolgte die schrittweise Homogenisation in 1 ml 80%igem Aceton. Nach einer 120-minütigen Schüttelphase erfolgte ein Zentrifugationsschritt (15 min, 13000 rpm, Tischzentrifuge), der zur Abtrennung von Zell-, Gewebe- und Filtertrümmern diente. Der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Probenmaterial wurde folglich mit 500 µl HPLC-H<sub>2</sub>O gewaschen. Für eine halbe Stunde wurden die Proben mit dem Wasser schüttelnd inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Auch dieser Überstand wurde gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Probenmaterial wurde im Anschluss in 1 ml Puffer A gelöst und steril filtriert, um die HPLC-Säule vor Verunreinigungen zu schützen. Für die Analyse wurde eine 1:50 Verdünnung der Extrakte eingesetzt, um eine optimale Konzentration der Aminosäuren (AS) zu gewährleisten.

Vor der jeweiligen Analyse erfolgte die Reinigung der HPLC-Anlage durch die sich abwechselnde Spülung der Pumpen mit dem Puffer A und Puffer B. Die Kalibrierung der Säule wurde im Anschluss mit dem Proben-Puffer A durchgeführt. Die hergestellten Extrakte wurden in die HPLC-Vials überführt und dienten der Analyse. Die Derivatisierung (Vorsäulenderivatisierung) der Aminosäuren erfolgte unter Zugabe von 50 µl OPA-Reagenz, zu jeweils 50 µl der Extrakte. 10 µl der derivatisierten Proben wurden auf die Säule appliziert und bei einem binären Gradienten aus Puffer A und B (bis der Anteil von Puffer B 100 % betrug) laufen gelassen. Dadurch erreichte man ein verzögertes Ablösen der Aminosäuren von der Säulenmatrix, sodass die einzelnen Aminosäuren hintereinander als Peak erschienen. Die Detektion der Aminosäuren erfolgte beim Austreten aus der Säule durch eine Fluoreszenzanregung mit einer Xenon-Lampe. Der Zeitpunkt des Austritts der Aminosäuren aus der Säule (Retentionszeit) und ein Aminosäurestandard (Sigma-Aldrich) ermöglichten eine genaue Identifikation des Aminosäurepeaks.



### 2.3.11 Flammenphotometrie

Die quantitative Bestimmung der Kaliumkonzentration erfolgte mit Hilfe des Jenway Flammenphotometers PFP7 der Firma Landgraf. Gelöste Alkali- oder Erdalkalisalze werden nach dem Zerstäuben in eine stark, entleuchtete Flamme eingeblasen. Dort erzeugen sie konzentrationsabhängig eine ihren Spektrallinien entsprechende Flammenfärbung. Die Spektrallinie des betreffenden Metalls (Kalium emittiert eine violette Flammenfärbung) wird durch einen Interferenzfilter herausgefiltert und die Lichtstärke mittels Photozelle und Galvanometer gemessen. Aus vorher aufgestellten Eichkurven (Intensität vs. Konzentration) mit Lösungen definierter Konzentrationen, kann im Anschluss unter Ausnutzung der Kurve des Metallgehaltes einer Lösung mit unbekannter Konzentration vermessen werden (Berry et. al., 1946).

### 2.3.12 Elektronenmikroskopie

#### Transmissions-Elektronenmikroskopie

Bei der Durchstrahlungs- oder Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) werden die transmittierten Elektronen zur Abbildung des Objektes benutzt. Dies ermöglicht eine hoch aufgelöste Abbildung von Objekten bis in den Sub-Nanometerbereich. Die Probe muss hierzu durchstrahlbar sein. Die Probendicke in Richtung des Elektronenstrahls darf maximal wenige 100 nm betragen. Für die Bildentstehung werden die ungestreuten Elektronen ausgeblendet, sodass der Hauptanteil aus Elektronen besteht, die in größere Winkel elastisch gestreut werden.

Da sich *Nodularia* CCY9414 infolge des Vorhandenseins von Gasvakuolen nicht abzentrifugieren lässt, wurde das Probenmaterial zunächst über Filter (Whatman GF/F) gezogen. Anschließend wurden die Proben mit Glutaraldehyd (2,5 %, w/v) in 0,1 M Phosphatpuffer (PBS) vom Filter gewaschen und für die Mikroskopie fixiert. (Hackenberg et al., 2012)

#### Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS)

EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy)

Trifft ein Elektronenstrahl auf Materie, z.B. ein elektronenmikroskopisches Präparat, so treten die Elektronen des Primärstrahles in Wechselwirkung mit den Atomen des Präparates. Die Wechselwirkung der einfallenden Elektronen mit dem Präparat-Atom

wird allgemein als Streuung bezeichnet. Eine elastische Streuung liegt vor, wenn die Elektronen beim Durchgang durch das Präparat nur ihre Richtung, nicht aber ihre Energie, d.h. ihre Geschwindigkeit, ändern. Inelastisch gestreute Elektronen haben an Präparat-Atome Energie übertragen und verlassen das Präparat mit geringerer Geschwindigkeit, also mit einem Energieverlust. Sie tragen damit die Information über Art und Zustand von Präparat-Atomen (Einführung in eine neue Dimension der Elektronenmikroskopie Seite 3-8, Zeiss 1984). F. P. Ottensmeyer setzte dies als Erster konsequent bei der Untersuchung von biologischen, aber auch anorganischen Proben ein (Ottensmeyer, 1973 und 1981).

### **Elementspezifisches Abbildungsverfahren**

Durch die Anwendung des elementspezifischen Abbildungsverfahrens, besser bekannt als „element mappings“ (ESI) ist es möglich ein Verteilungsbild eines bestimmten Elementes zu erhalten (Körtje, 1996). Hierzu wird ein Präparat genau mit der Ionisationsenergie bestrahlt, welche spezifisch für das zu untersuchende Element ist. Der Energiefilter muss genau auf die Ionisationskante des Bereiches gesetzt werden, die dem zu untersuchenden Element entsprechen. Hat man den Energiefilter dementsprechend gesetzt, tragen nur solche Elektronen zum Bild bei, welche zu der jeweiligen Kante gehören. Somit erhält man eine elementsensitive Abbildung.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *In silico*-Analysen

Zu Beginn der Arbeiten wurden ausgedehnte BLASTp Analysen des damals unveröffentlichten *Nodularia* CCY9414 Genoms vorgenommen. In diesen *in silico* Untersuchungen wurde die *Nodularia* CCY9414 Genomsequenz durch einen Vergleich mit denen verschiedener Cyanobakterien-Stämme (*Synechocystis* sp. 6803 und *Anabaena* sp. PCC 7120) re-annotiert (Voß et al., 2013), um zunächst das Vorhandensein photorespiratorischer Gene zu bestätigen. Es konnten fast alle bereits charakterisierten photorespiratorischen Gene aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 bzw. *Arabidopsis thaliana* (Eisenhut et al., 2008) nachgewiesen werden. Alle erforderlichen Enzyme für die Photorespiration sind auch in *Nodularia* CCY9414 (Tabelle 1) vergleichbar zu anderen Cyanobakterien (Eisenhut et al., 2006) im Genom kodiert.

**Tabelle 1: *in silico*-Analysen zur Identifizierung von Genen für photorespiratorische Enzyme im *Nodularia* CCY9414 Genom durch BLASTp-Analysen.** Zusammenfassend dargestellt sind die Ergebnisse der lokalen Alignments einschließlich Identität und Ähnlichkeit („Positiv“) der Proteinsequenz von *Nodularia* CCY9414 zur Referenzproteinsequenz.

Protein	ORF in PCC 6803/ PCC 7120	Gen in <i>Nodularia</i> CCY9414	Identität in %	Übereinstimmung (Positiv) in %
<b>Photorespirations Gene (CO<sub>2</sub>-Limitierung)</b>				
Phosphoglycolat-Phosphatase	sll1349	EAW43743	52	70
Glycolat-Oxidase	all0170	kein Homolog		
Glycolat-Dehydrogenase	sll0404	EAW43978	74	87
GlcD1	slr0806	EAW44746	57	65
Serin: Glyoxylat - Aminotransferase	sll1559	EAW44964	71	82
Glutamat:Glyoxylat Aminotransferase	alr2765	EAW43822	90	96
GDC T-Protein	sll0171	EAW44899	64	78
GDC P-Protein	slr0293	EAW44901	72	83
GDC H-Protein	slr0879	EAW44900	53	72
GDC L-Protein	slr1096	EAW44961	74	85
Serin:Hydroxymethyl-transferase	sll1931	EAW42876	78	87
Hydroxypyruvat-Reduktase 1	sll1908	EAW47247	79	89
Hydroxypyruvat-Reduktase 2	slr1556	kein Homolog		
Glycerat-Kinase	alr2783	EAW43474	71	83
Tartronat-Semialdehyd-Reduktase	slr0229	kein Homolog		
Glyoxylat Carboligase	slr2088	EAW47101	75	84

Diese Analysen wurden ausgedehnt, indem auch nach Homologen von Markerproteinen für bestimmte Stresssituationen im *Nodularia* CCY9414-Genom gesucht wurde (Tabelle 2). Diese Gene wurden dann in späteren Expressionsanalysen genutzt, um Rückschlüsse aus dem Genexpressionsmuster auf die vorherrschenden Bedingungen ziehen zu können.

**Tabelle 2: *in silico*-Analysen zur Identifizierung von Genen für charakteristische Stressproteine im *Nodularia* CCY9414 Genom** durch BLASTp-Analysen zu deren Nutzung als Markergene in Freilanduntersuchungen. Zusammenfassend dargestellt sind die Ergebnisse der lokalen Alignments einschließlich Identität und Ähnlichkeit („Positiv“) der Proteinsequenz von *Nodularia* CCY9414 zur Referenzproteinsequenz.

Protein	ORF in PCC 6803/ PCC 7120	Gen in <i>Nodularia spumigena</i> CCY9414	Identities in %	Positives in %
<b>CO<sub>2</sub>-Limitierung</b>				
Natrium-Bicarbonat-transporter <i>sbtA</i>	slr1512	EAW46250	67	81
NADH-Dehydrogenase NDH-1 <sub>3</sub>	slr0331	EAW46024	80	88
<b>Nitrat-Limitierung</b>				
Nitrogenase-Reduktase <i>nifH</i>	alr0874	EAW46334	92	96
<b>Fe-Limitierung</b>				
Photosystem II Chl <i>a</i> -bindendes Protein <i>isiA</i>	slr0247	EAW46340	73	86
Acetyl-CoA-acetyltransferase <i>fadA</i>	alr1382	EAW44752	57	77
<b>Oxidativer und Starklicht-Stress</b>				
Superoxid-Dismutase <i>sodB</i>	alr2938	EAW45715	90	93
Orange-Carotin-Protein <i>ocp</i>	slr1963	EAW42864	57	71
Photosystem II Protein D1 (PsbA)	slr1311	EAW44049	91	97
CAB/ELIP/HLIP Superfamilie	asr5262	EAW43971	83	91
β-Carotin-Ketolase	alr3189	EAW43072	57	74
Ubichinon-Monooxygenase (UbiB)	all4960	EAW42854	80	88
Sporulation-germination Protein	YP_007078596 <i>Nostoc</i> sp. PCC 7524	EAW44688	74	85
Hypothetisches Protein	NP_488474 PCC 7120	EAW44742	79	90
NbIA Phycobilisomenabbau-Protein	YP_007078113 <i>Nostoc</i> sp. PCC 7524	EAW43481	92	100
CcmK	NP_484911 PCC 7120	EAW46673	97	100
CP12	YP_007074960 <i>Nostoc</i> sp. PCC 7524	EAW43734	76	87

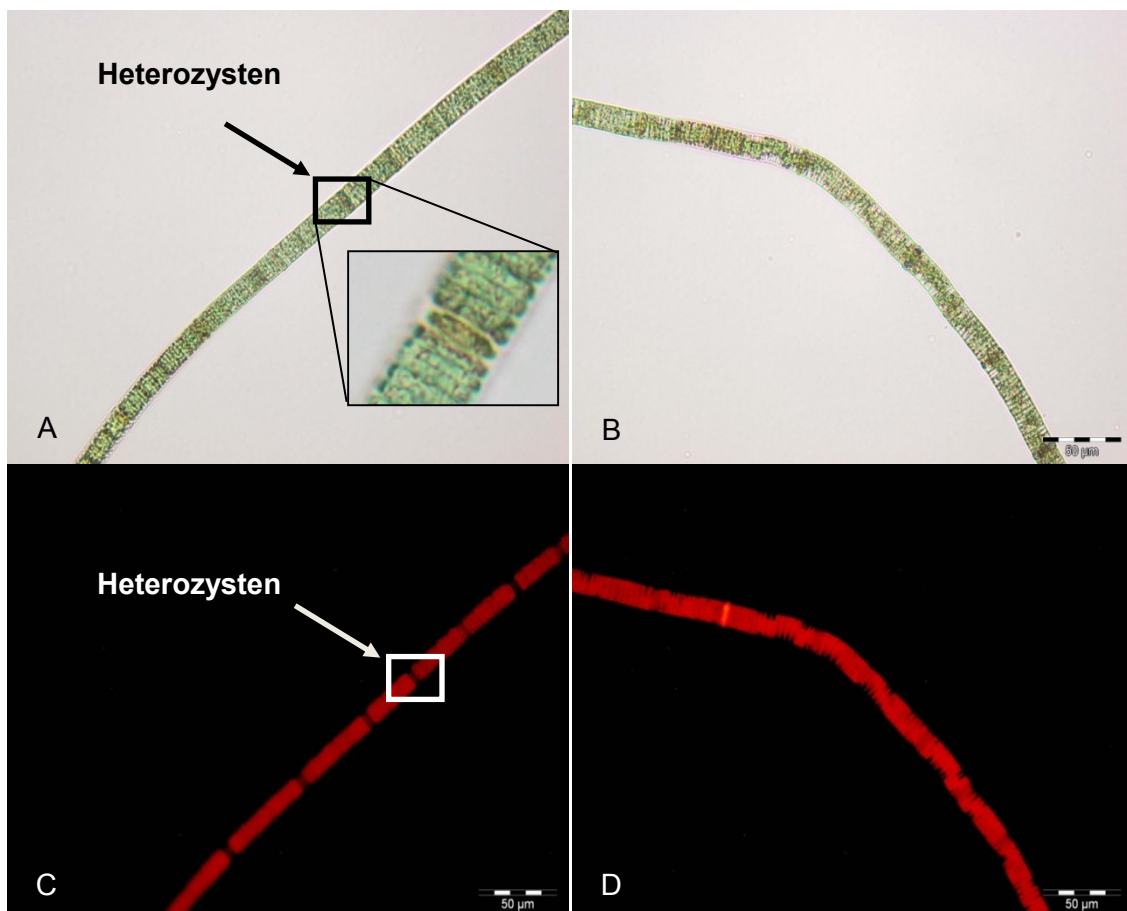
Mycosporine-Cluster nach Gao und Garcia-Pichel 2011 in <i>Nostoc punctiforme</i> ATCC 29133				
Dimethyl 4 Desoxygadusol Synthase	Npun_R5600 ATCC 29133	EAW44170	85	92
O-Methyltransferase	Npun_R5599 ATCC 29133	EAW44169	83	91
C-N-ligase	Npun_R5598	EAW44167	82	89
D-alanin-D-alanin ligase	Npun_F5597	EAW44166	77	90
<b>Salzstress</b>				
Saccharose-phosphat-synthase <i>spsA</i>	slI0045	EAW45818	54	69
<b>Phosphatstress</b>				
Alkalische Phosphatase <i>alk.P</i>	slI0654	EAW47381	72	82
ATPase (ABC-Phosphat-Transporter) <i>ppts</i>	all8090	EAW47337	48	65
Phosphatbindeprotein <i>PstS2</i>	all0911	EAW43239	83	92
Polyphosphatkinase <i>ppk</i>	alr3593	EAW45226	86	92
<b>Konstitutives Referenzgen</b>				
Ribonuklease P <i>rnpB</i>	alr3413	EAW46112	72	82

**Tabelle 3: *in silico*-Analysen zur Identifizierung von Genen für Enzyme zur Nodularinsynthese im *Nodularia CCY9414* Genom durch BLASTp-Analysen.**

Protein	ORF in NSOR10	Gen in <i>Nodularia</i> CCY9414	Identities in %	Positives in %
Nodularin Synthetase <i>ndfA</i>	AEU11109	EAW45757 1594-1723 aa	91	95

### 3.2 Etablierung des Kultursystems

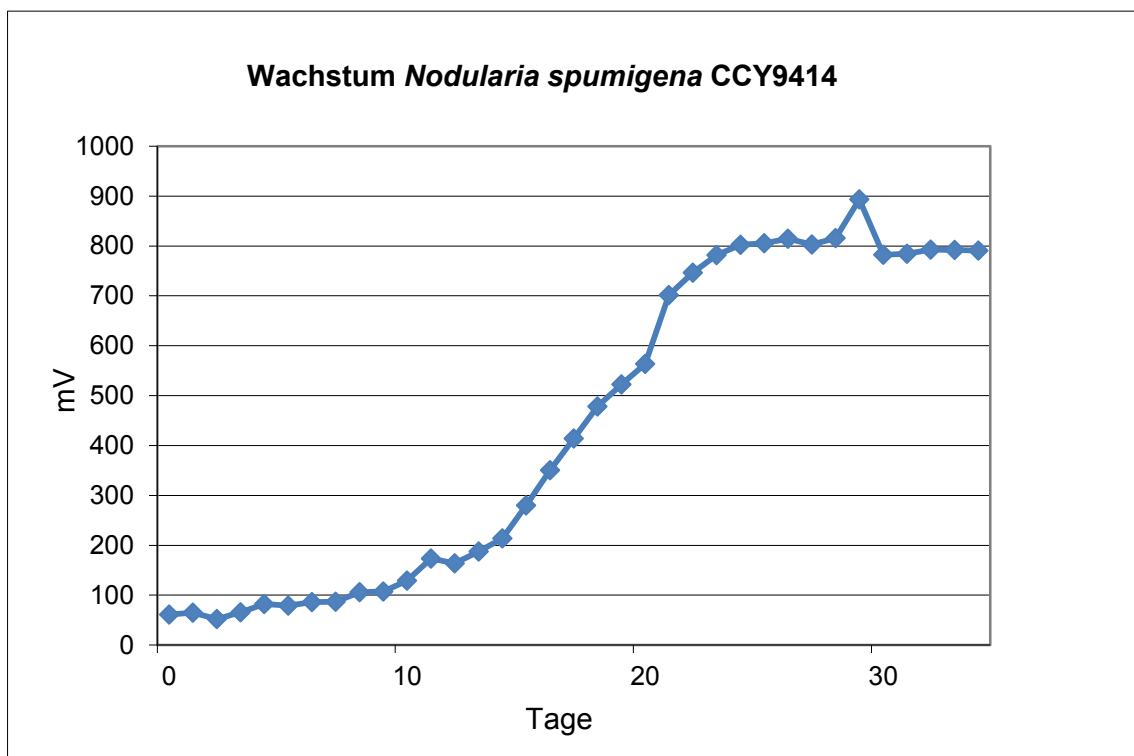
Als diazotrophes Cyanobakterium bildet *Nodularia* CCY9414 Heterozysten für die notwendige Stickstofffixierung. Um Spontanmutationen zu vermeiden, wurde parallel zur Anzucht mit Nitrat im Medium eine unter stickstofffixierenden Bedingungen (ohne Stickstoff) stattfindende Stammkultivierung mitgeführt. In Abbildung 7 sind mikroskopische Aufnahmen von Zellfäden beider Kultivierungen zu sehen. Mit Hilfe von Blaulicht wurde Chlorophyll in vegetativen Zellen zum Fluoreszieren gebracht, sodass Heterozysten als nichtfluoreszierende Bereiche deutlich durch die unterbrochenen Schwarzfärbungen des fluoreszierenden Kulturfadens zu erkennen sind. Im Gegensatz dazu sind bei der Kultivierung im Nitrat-haltigen Medium nur sehr wenige bis keine Heterozysten zu erkennen. Da die Nitrat-freie Kultivierung eher die Situation der Blütenbildung simuliert, erfolgten Experimente und Beprobung hauptsächlich unter dieser Kulturbedingung.



**Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie von *Nodularia* CCY9414.** Die Bilder A und B zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen eines Kulturfadens aus einer Nitrat-freien (Bild A) und einer Nitrat-haltigen (Bild B) Kultivierung. Dazu passen die Fluoreszenzaufnahmen in den Bildern C (Nitrat-frei) bzw. D (Nitrat-haltig). Markiert sind die Heterozysten.

### 3.2.1 Wachstumsmessung

Mit Hilfe der von Gustavs et al. (2009) beschriebenen fluorimetrischen Wachstumsbestimmung (Abbildung 8) konnte gezeigt werden, dass unter den Standardkulturbedingungen das exponentielle Wachstum von *Nodularia* CCY9414 für 14 bis 20 Tage anhält. Daher wurden die Kulturen alle 14 Tage, nachdem sie eine optische Dichte bei 750 nm von ca. 0,2-0,3 erreicht hatten, neu angeimpft bzw. für die Bestimmung verschiedener Parameter geerntet. Ein schwer zu lösendes Problem bestand in der Wahl eines geeigneten Bezugsparameters für folgende Analysen. Die photometrische Messung der optischen Dichte der Suspension ist äquivalent der Biomassekonzentration und dient als Standardbezugsparameter bei Laborstämmen wie *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Klähn et al., 2010). Diese Methode konnte jedoch für *Nodularia* CCY9414 nicht verwendet werden, da die Suspension auf Grund der Gasvakuolen der Zellen nicht homogen genug ist.



**Abbildung 8: Graphische Darstellung** des Wachstums von *Nodularia* CCY9414 unter Standardbedingungen (siehe 2.1) nach Messung mit dem Wachstumsfluorimeter.

Mit Hilfe des Wachstumsfluorimeters wurde die Zunahme der Biomasse als PSII-Fluoreszenz gemessen. Diese Methode ist sehr sensitiv. Allerdings war diese Messung als Bezugsparameter zur Untersuchung der Stressanpassung von *Nodularia* CCY9414

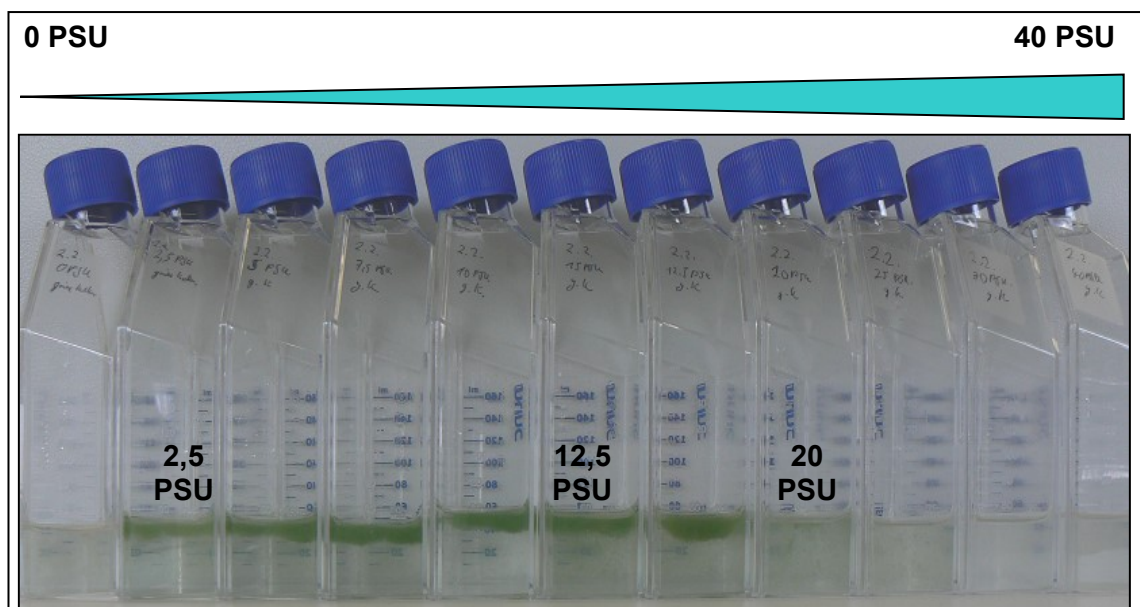
nicht praktikabel, da eine kombinierte Beprobung und Wachstumsmessung nicht möglich ist.

Alternativ wurden Pigmentmessungen bzw. Trockenmassebestimmungen als Methoden zur Ermittlung eines Bezugsparameters getestet. Für die Pigmentbestimmung wurden große Mengen der Kultur benötigt. Zusätzlich war es schwierig, auf Grund der Gasvakuolen definierte Mengen an Algenmaterial zu entnehmen. Dies führte lediglich zu stark schwankenden Werten und schränkte die Reproduzierbarkeit ein. Schließlich stellte sich die Bestimmung der Trockenmasse als praktikabelster Bezugsparameter zur Charakterisierung der Biomasse bzw. des Wachstums (Garcia-Pichel et al., 1992) heraus.

### 3.3 Salzstress

Nach Etablierung des Untersuchungsprotokolls (siehe 2.3.3) wurde zunächst die Salzstressanpassung des Stammes *Nodularia* CCY9414 untersucht. Hierzu wurde *Nodularia* CCY9414 zunächst unter N<sub>2</sub>-fixierenden Bedingungen in Medien mit verschiedenen Salinitäten angezogen (Abbildung 9).

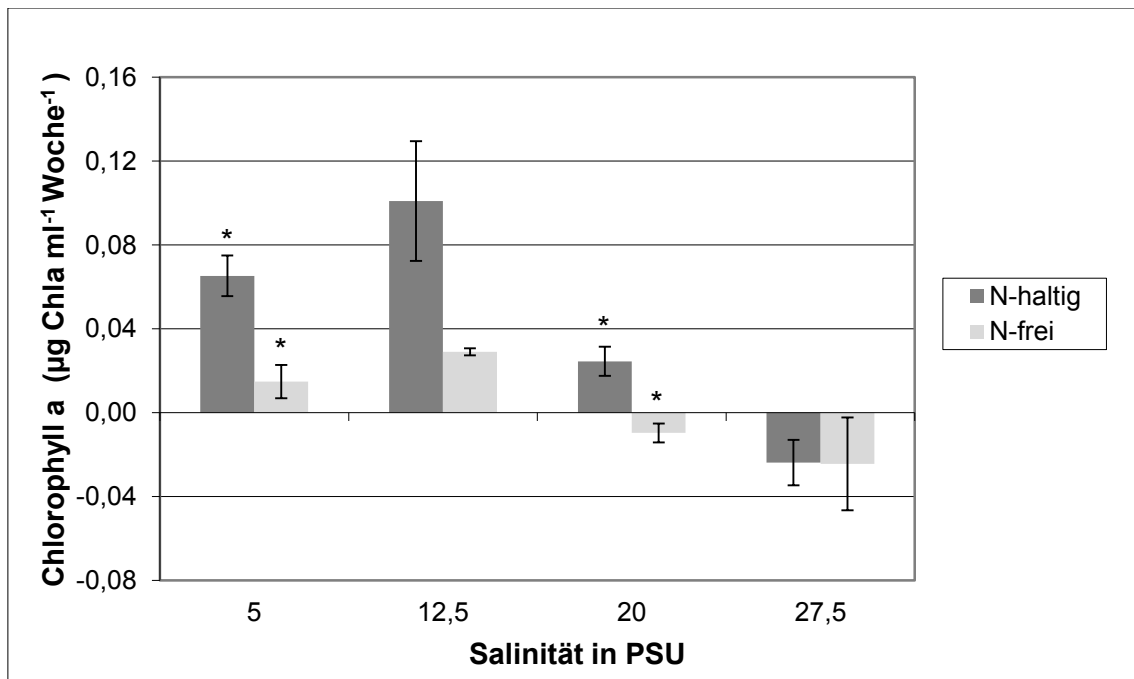
Abbildung 9).



**Abbildung 9: Wachstum von *Nodularia* CCY9414 bei verschiedenen Salzgehalten.** Salinitäten von 0 bis 40 PSU wurden durch NaCl-Zugabe zum ASN3 Medium eingestellt und die Zellsuspensionen nach 14-tägiger Inkubation unter den in 2.2 beschriebenen Kultivierungsbedingungen fotografiert.



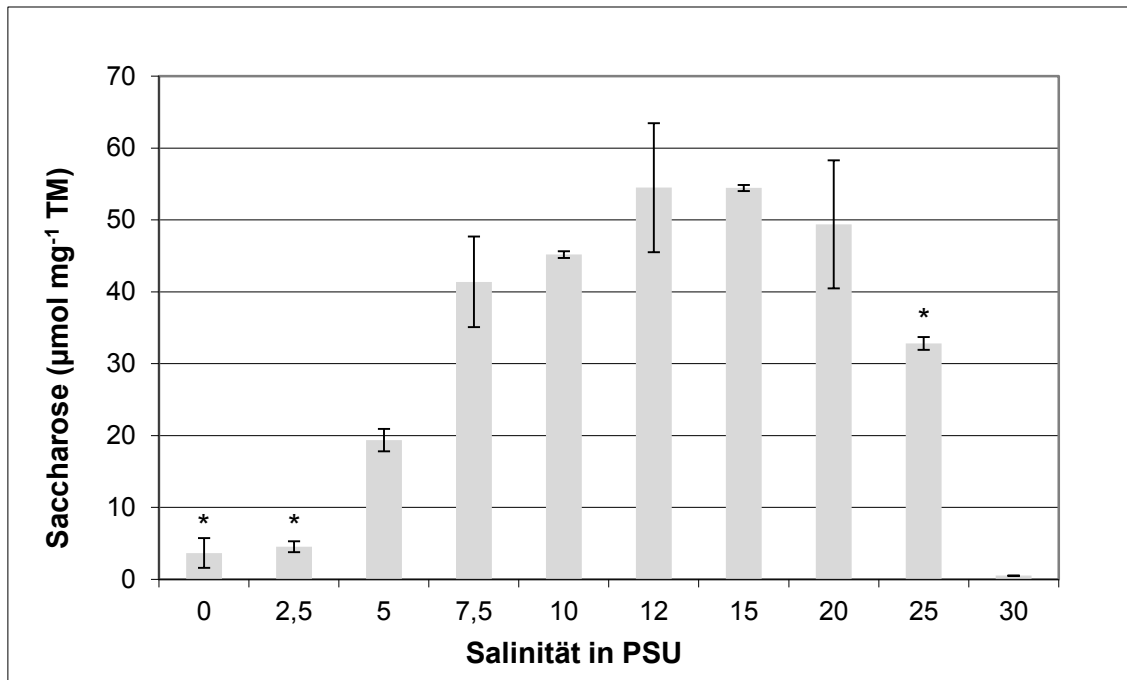
Es war ein Wachstum der Kultur von 2,5 bis 20 PSU zu beobachten. Erstaunlich war, dass die Zellen im Medium ohne erhöhte NaCl-Gehalte komplett abstarben. Dieses Verhalten im Salzgradienten korreliert mit den Erkenntnissen der geographischen Analysen (siehe 1.3). Unter unseren Kulturbedingungen war mit *Nodularia* CCY9414 ein Wachstumsoptimum bei der Salinität von 12,5 PSU zu beobachten. Als Indikator für das Wachstum wurde zunächst die Zunahme der Chl-*a*-Konzentration herangezogen, welche das stärkste Wachstum bei 12,5 PSU zeigte (Abbildung 10). Auch die quantitative Auswertung erbrachte die höchste Wachstumsrate bei 12,5 PSU. Dieses Ergebnis stellte sich sowohl bei N<sub>2</sub>-fixierenden (N-frei) als auch Nitrat-kultivierten (N-haltig) Zellen heraus. Die geringere Zunahme des Chlorophylls bei den N<sub>2</sub>-fixierenden Zellen liegt an der geringeren Zelldichte nach Beimpfen der Kulturen (Abbildung 8).



**Abbildung 10: Zunahme der Chl-*a*-Konzentration von *Nodularia* CCY9414 Suspensionen nach 7 Tagen bei verschiedenen Salinitäten.** Zellen wurden in einem Nitrat-haltigen Medium (dunkel-grau) bzw. einem Nitrat-freien (hell) Medium vergleichend angezogen. Durch ein Sternchen (\*) gekennzeichnet ist die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) der Unterschiede in Bezug zur Standardkultivierung bei 12,5 PSU.

### 3.3.1 Analyse niedermolekularer Stoffe

Gaschromatische Untersuchungen zeigten, dass Saccharose als dominierendes „compatible solute“ akkumuliert wird (Abbildung 11). Neben Saccharose wurde kein weiterer Peak im GC-Chromatogramm detektiert.



**Abbildung 11: Saccharosekonzentration in Abhängigkeit zur Salinität.** *Nodularia* CCY9414 wurde nach 7-tägiger Nitrat-freier Kultivierung bei unterschiedlichen Salinitäten geerntet. Dargestellt sind Mittelwerte und SD (n=5). Durch ein Sternchen (\*) gekennzeichnet ist die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) der Unterschiede in Bezug zur Standardkultivierung bei 12,5 PSU.

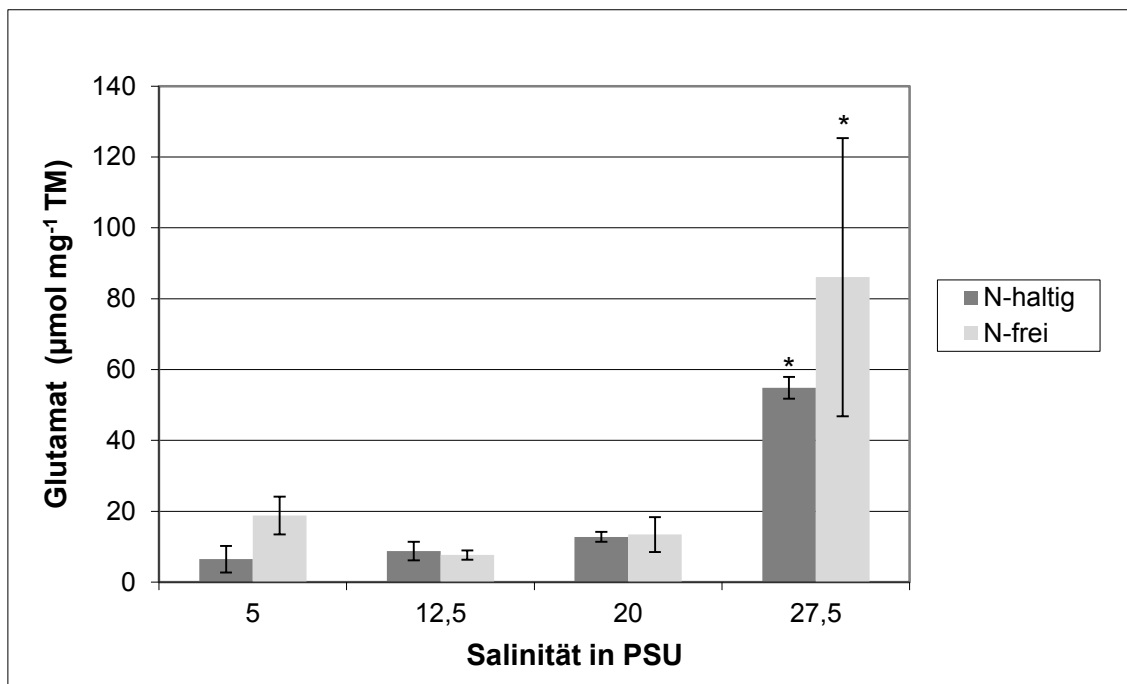
Die Saccharosekonzentration nimmt mit zunehmendem Salzgehalt zu. Ein Maximum tritt zwischen 12,5 – 20 PSU auf. Bei höheren Salinitäten sinkt die Saccharosemenge rapide ab. Diese Abnahme sowie die der Chlorophyllgehalte (Abbildung 10) deuten auf eine Lyse der Zellen hin.

Neben der Saccharosekonzentration wurden auch lösliche Aminosäuren mittels HPLC analysiert. Glutamat stellt mit ca. 50 % Anteil die dominierende Aminosäure dar (Tabelle 4). In *Nodularia* CCY9414 kommt es zu einem starken Anstieg in der Glutamatkonzentration bei sehr hohen Salinitäten (Abbildung 12), während beim Wachstumsoptimum von 12,5 PSU nur sehr wenig Glutamat akkumuliert wird. Somit scheint neben Saccharose das Glutamat ein zusätzliches „compatible solute“ unter Bedingungen darzustellen, die das Wachstum negativ beeinflussen.

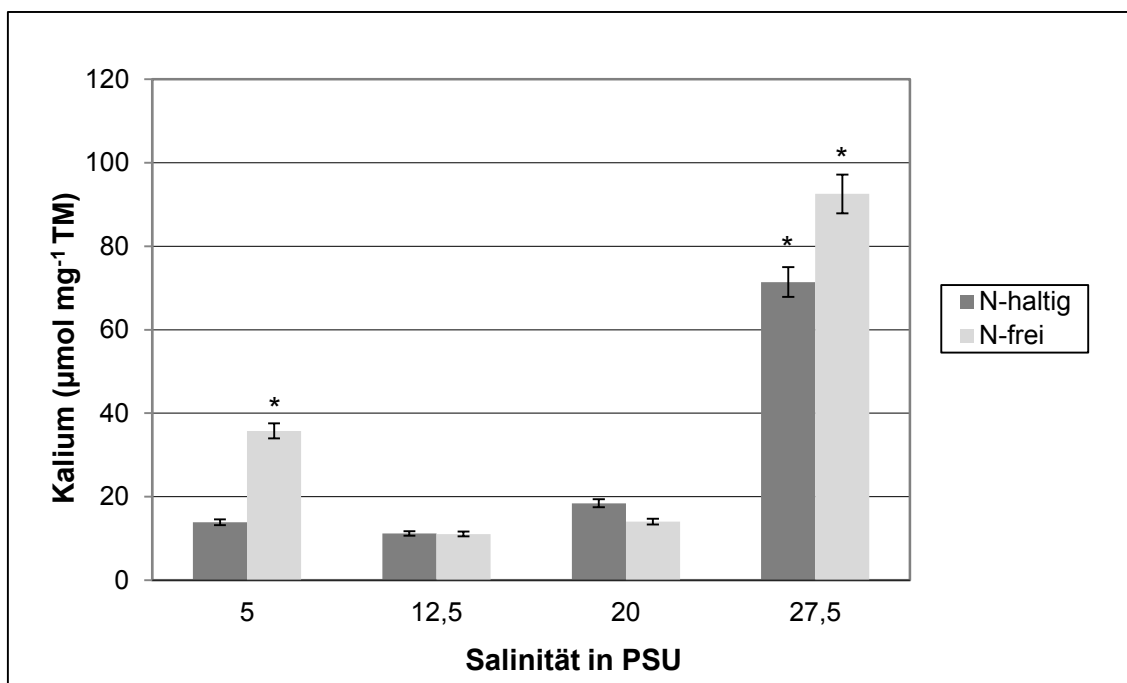
**Tabelle 4: HPLC-Analysen.** Aminosäurekonzentrationen (pmol/10 ml Probe) nach 7 Tagen Kultivierung von *Nodularia* CCY9414 bei verschiedenen Salinitäten.

	Name	Nitrat-haltig				Nitrat-frei			
		5 PSU	12,5 PSU	20 PSU	27,5 PSU	5 PSU	12,5 PSU	20 PSU	27,5 PSU
1	Aspartat	10,66	10,44	8,23	11,87	10,44	8,00	8,17	8,14
2	Glutamat	32,44	74,43	71,86	116,71	45,06	70,99	94,72	130,48
3	Asparagin	0,44	0,59	0,80	1,15	0,63	0,61	1,44	1,07
4	Serin	7,85	8,85	7,08	6,34	8,18	4,14	8,94	8,38
5	Glutamin	0,66	6,43	10,05	10,65	7,65	9,06	10,98	12,66
6	Glycin	3,99	2,09	1,77	1,97	4,26	5,87	4,52	4,11
7	Threonin	1,66	1,79	1,45	1,43	2,38	1,90	1,80	1,66
8	Histidin	0,54	0,50	0,47	0,36	1,49	0,43	0,55	0,59
9	Alanin	5,98	8,77	7,28	8,11	8,73	8,49	9,86	9,97
10	Arginin	2,47	1,62	0,88	1,93	2,60	1,75	1,58	1,41
11	Tyrosin	1,01	0,97	0,78	0,77	1,37	1,71	2,06	1,76
12	Valin	2,95	2,46	1,63	1,67	3,46	2,35	2,21	1,99
13	Methionin	0,07	0,07	0,05	0,04	0,04	0,04	0,07	0,07
14	Tryptophan	3,49	2,17	2,63	3,91	2,30	2,28	3,41	4,09
15	Phenyl-alanin	0,67	0,56	0,46	0,41	0,96	0,84	0,92	0,83
16	Isoleucin	1,37	1,11	0,80	0,73	1,64	1,23	1,32	1,19
17	Leucin	5,92	5,14	3,21	3,13	7,53	5,96	5,99	5,50
18	Lysin	0,17	0,15	0,14	0,16	0,17	4,23	7,14	6,14
	<b>Total</b>	<b>82,34</b>	<b>128,11</b>	<b>119,58</b>	<b>171,33</b>	<b>108,89</b>	<b>129,88</b>	<b>165,66</b>	<b>200,02</b>

Die Ermittlung der Kaliumkonzentration in *Nodularia* CCY9414-Zellen nach Kultivierung bei den verschiedenen Salinitäten erfolgte mit Hilfe der Flammenphotometrie. Ein starker Anstieg der K<sup>+</sup>-Konzentration war für beide Kultivierungen (Nitrat-haltig bzw. -frei) ab einer Salinität von 27,5 PSU zu beobachten (Abbildung 13).



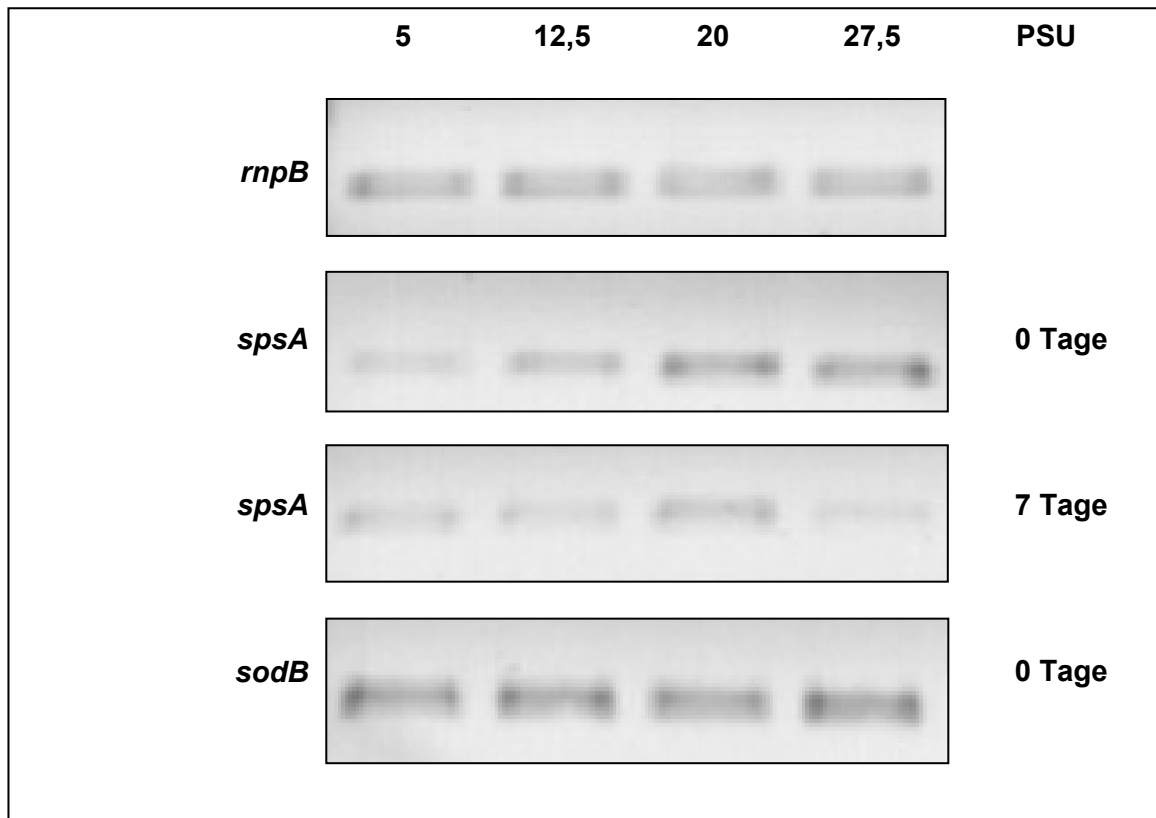
**Abbildung 12: Zunahme der Glutamatkonzentration in Abhängigkeit von der Salinität und Anzucht mit und ohne Nitrat** nach 7 Tagen zu verschiedenen Salinitäten (n=3). Die Kultivierung fand in einem Nitrat-haltigen Medium (dunkel-grau) bzw. N-freiem (hell) Medium statt. Durch ein Sternchen (\*) gekennzeichnet ist die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) der Unterschiede in Bezug zur Standardkultivierung bei 12,5 PSU.



**Abbildung 13: Kaliumkonzentration in Abhängigkeit von der Salinität und Anzucht mit und ohne Nitrat** nach 7 Tagen bei verschiedenen Salinitäten. Durch ein Sternchen (\*) gekennzeichnet ist die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) der Unterschiede in Bezug zur Standardkultivierung bei 12,5 PSU.

### 3.3.2 Expressionsanalysen

Durch RT-PCR wurde die Expression verschiedener Gene unter Salzstressbedingungen verglichen. Mittels eines sogenannten „Haushaltgenes“ *rnpB* (Gen für die RNA-Untereinheit der RNaseP mit gleichbleibender Expressionsstärke) wurde die cDNA-Konzentration kalibriert.

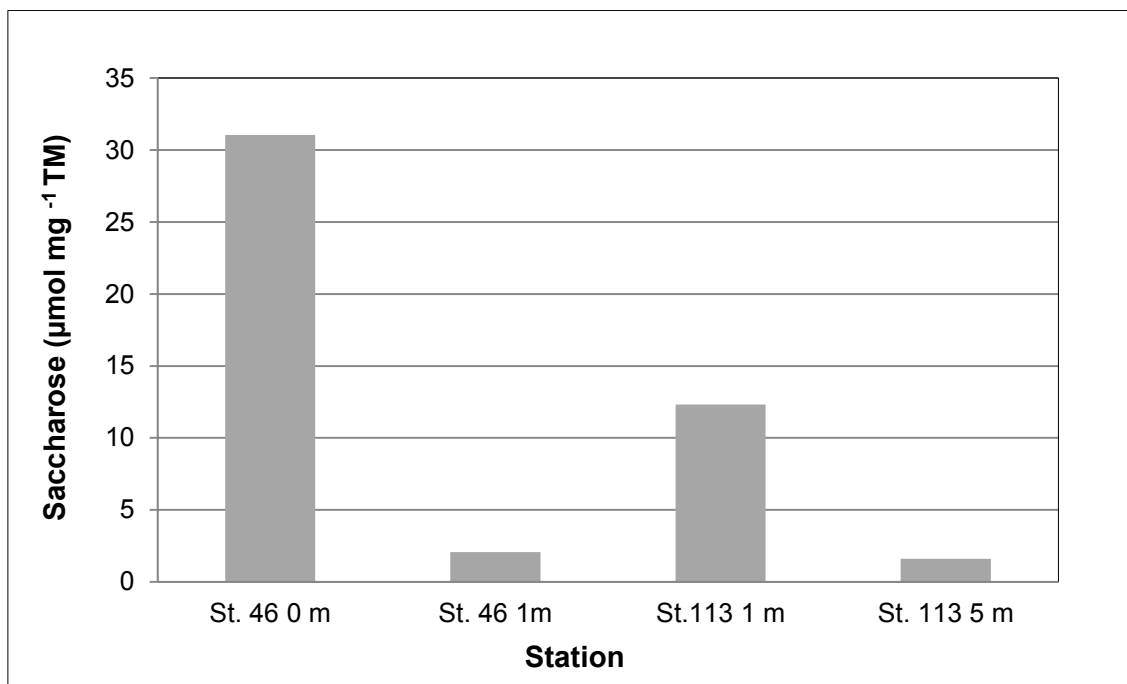


**Abbildung 14: Genexpressionsanalysen in Abhängigkeit von der Salinität und verschiedenen Zeitpunkten.** RNA wurde aus Zellen von *Nodularia* CCY9414 nach 6 Stunden (0 Tage) bzw. 7 Tagen Salzstressbedingungen isoliert. *rnpB* – RNase P-Haushaltsgen, *spsA* – Saccharose-6-Phosphat Synthase, Enzym für Saccharosesynthese und *sodB* – Fe-abhängige Superoxiddismutase als generelles Stressgen.

Beim Salzstressversuch wurden 6 Stunden bzw. 7 Tage nach Ansatz der Kulturen Proben zur Genexpressionsanalyse entnommen. Es konnte 6 Stunden nach Transfer in erhöhten Salinitäten eine verstärkte Expression des Gens für die Saccharose-6-Phosphat Synthase (*spsA*) nachgewiesen werden (Abbildung 14). Diese Expressionszunahme korreliert gut mit der verstärkten Verwendung von Saccharose als „compatible solute“. Nach 7 Tagen Salzstress ist die Expression nicht mehr direkt proportional zur externen Salinität. Dagegen wurden beim Gen *sodB*, welches ein Entgiftungsprotein bei oxidativem Stress kodiert, keine Expressionsunterschiede nach Salzstress beobachtet.

### 3.3.3 Gaschromatographische Analysen an Freilandproben

Das Laborergebnis, dass Saccharose als Osmolyt in *Nodularia* CCY9414 dominierten Blüten fungiert (Abbildung 11), konnte durch die Analyse von Freilandproben bestätigt werden. Dank Dr. Norbert Wasmund (IOW) erfolgte eine Beprobung einer *Nodularia*-dominierten Blüte aus der Arkonasee (54 27.9318 N 012 13.0637 E) im Sommer 2012. In Abbildung 15 wird deutlich, dass eine erhöhte Saccharosekonzentration in der Oberflächenprobe der Station 46 zu beobachten war. 16s rDNA-basierte Analysen der Populationsstruktur (siehe Referenzbäume im Anhang) bestätigten eine deutliche Dominanz von *Nodularia*-Stämmen in der Oberflächenprobe von Station 46.



**Abbildung 15: Saccharosekonzentration in Abhängigkeit zum Standort.** Die Probe bei 0 Meter Wassertiefe (Wasseroberfläche, blühende Cyanobakterien) von Station 46 zeigt ein stark erhöhtes Saccharosevorkommen gegenüber dem Standort Station 113 sowie auch den Tiefenproben (1 und 5 Meter).

### 3.4 Licht- und O<sub>2</sub>-Stress

Ziel dieses Versuches war es, den Einfluss von Starklicht und erhöhten Sauerstoffkonzentrationen auf die Expressionseigenschaften spezifischer Gene zu untersuchen, da diese Umweltbedingungen für die Blütenbildung von *Nodularia* CCY9414 relevant sind.

#### 3.4.1 Versuchsaufbau

Für den Versuch (Abbildung 16) wurde eine *Nodularia* CCY9414 Kultur durch eine Gasmischungsanlage (GMS 600 2CH) der Firma QCAL mit einer definierten Sauerstoffkonzentration begast. Als Quelle für eine hohe Lichtbestrahlung, welche Starklichtintensitäten im Hochsommer repräsentiert, kam ein Diaprojektor der Firma Leica (Pradovit P150) zum Einsatz. Die Probenentnahme erfolgte in definierten Zeitabständen (0,5; 3 und 8 Stunden) nach folgenden vier Kulturvariationen:

1. Kontrollzellen, direkt aus der Vorkultivierung (19 °C, 40  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ )
2. Kultur unter Starklicht (1200  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) bei 60 cm Entfernung zur Lichtquelle
3. Kultur unter Hoch-O<sub>2</sub> (40 % Sauerstoff) bei Standardbelichtung von 40  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$
4. Kultur unter Starklicht (1200  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) und Hoch-O<sub>2</sub> (40 %).



**Abbildung 16: Licht- und O<sub>2</sub>-Stressversuch.** 1: Sauerstoffbegasung mit 40 % O<sub>2</sub> 2: Lichtquelle mit 1200  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ .

### 3.4.2 HPLC-Analysen

Parallel zur Genexpression wurde die Aminosäureakkumulation in den gestressten Zellen durch HPLC untersucht. Diese Messungen zeigen, dass die gewählten Stressbedingungen Einfluss auf den photorespiratorischen Zyklus nehmen, denn es kommt zu einem erhöhten Glycin/Serin-Verhältnis. Eine Akkumulation von Glycin ist charakteristisch für eine aktivierte Photorespiration nach einer Überführung von *Synechocystis* sp. PCC 6803 unter CO<sub>2</sub>-Mangelbedingungen (z.B. Eisenhut et al., 2008). Somit kann die Zunahme im Verhältnis dieser Intermediate der Photorespiration in Zellen von *Nodularia* CCY9414 bei Starklicht (speziell in der ersten halbe Stunde Zuwachs von 2,04) sowie bei erhöhten Sauerstoffkonzentrationen (nach 3 Stunden eine mehr als 4fache Konzentrierung von Glycin) als Zeichen für einen erhöhten Fluss in den C2-Zyklus angesehen werden. Auch nach kombiniertem Sauerstoff-/Starklichtstress nimmt dieses Verhältnis deutlich zu (Tabelle 5). Nach 8 Stunden ist unter allen Versuchsbedingungen eine Abnahme dieser Verhältnisse zu beobachten, obwohl diese auch dann noch deutlich über dem Kontrollwert liegen.

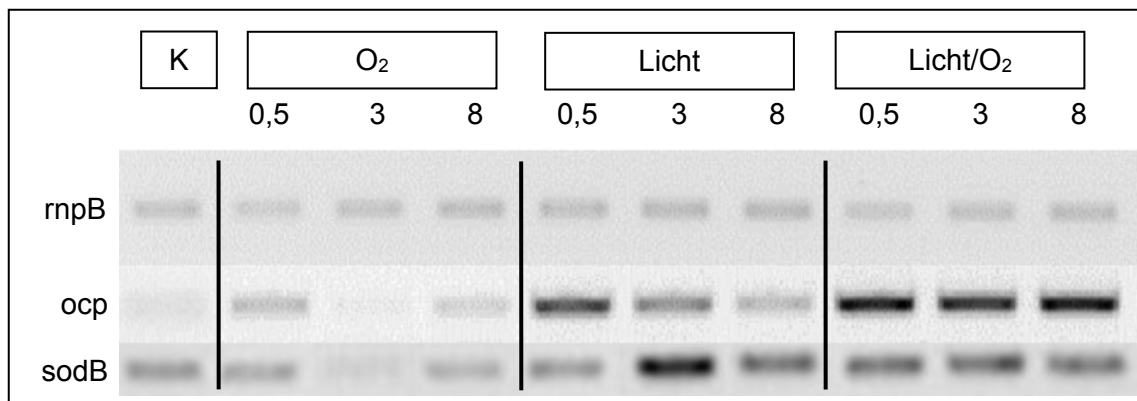
**Tabelle 5: Glycin-Serin-Verhältnis.** HPLC–Detektion dieser Aminosäuren in Zellen von *Nodularia* CCY9414 die für unterschiedliche Zeiten (0,5; 3 und 8 Stunden) O<sub>2</sub>, Starklicht oder kombiniertem O<sub>2</sub>/Starklichtstress ausgesetzt waren. Das Glycin/Serin-Verhältnis der Kontrollprobe aus der Vorkultivierung wurde auf 1 gesetzt. n=3

	Kontrolle	O <sub>2</sub>			Licht			Licht und O <sub>2</sub>		
Zeit in h	0	0,5	3	8	0,5	3	8	0,5	3	8
Glycin/Serin	1	1,49	4,44	2,71	2,04	1,41	1,99	2,19	3,02	1,81

### 3.4.3 Expressionsanalysen

Durch RT-PCR wurde die Expression verschiedener Gene unter Starklicht- und Sauerstoffstressbedingungen miteinander verglichen. Zur Überprüfung der gewählten Versuchsbedingungen wurden zunächst die Expressionsveränderungen sogenannter „Indikator-Gene“ für Starklicht- und Sauerstoffstress, wie z.B. *ocp* (EAW42864) und *sodB* (EAW45715), betrachtet. Ein Abgleich der cDNA-Menge erfolgte auch hier wieder mittels *rnpB*. Bei der RT-PCR wurden klar verstärkte Banden für *ocp* und *sodB* cDNA in den Proben unter Licht- bzw. in Kombination mit Sauerstoffstress innerhalb des Agarosegels im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Abbildung 17). Dies lässt auf eine erhöhte Expression unter den Starklicht-Stressbedingungen dieser Gene schließen.

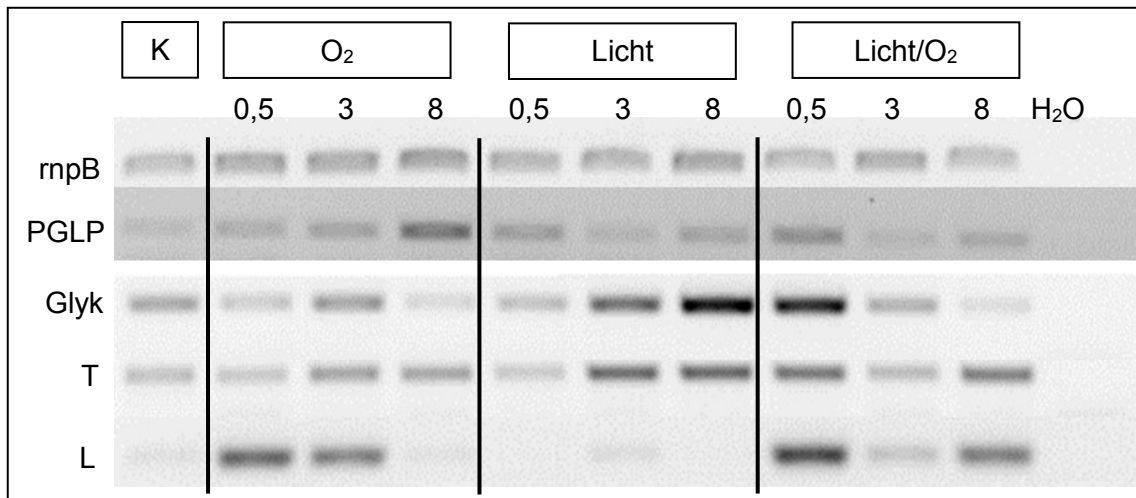




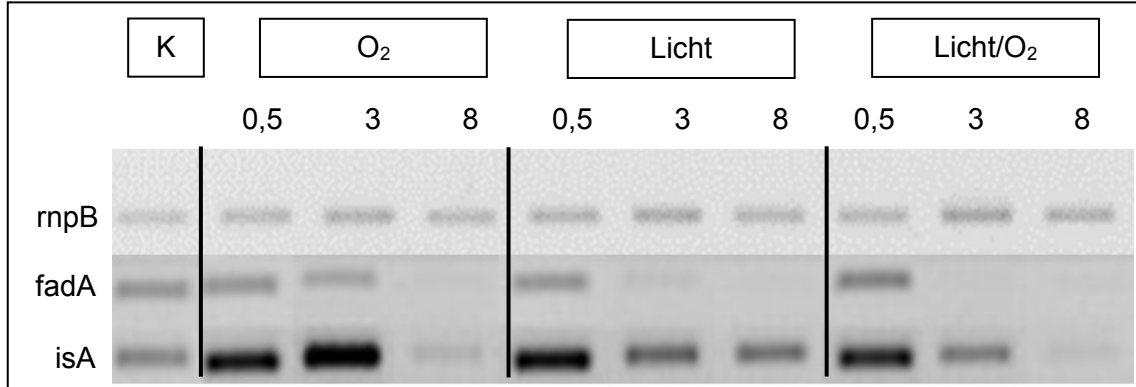
**Abbildung 17: RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung der *ocp* und *sodB* Expressionsstärke.** Die Expression des Orange-Carotin-Proteins und der Superoxid-Dismutase wurde in Zellen nach Exposition unter erhöhten Sauerstoffkonzentrationen (O<sub>2</sub>, 40 %), unter Starklichtbedingungen (Licht, 1200  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) bzw. unter kombiniertem Starklicht-/Sauerstoffstress (Licht/O<sub>2</sub>) für unterschiedlich lange Zeiten (0,5; 3 bzw. 8 Stunden) untersucht. Die oberen Banden zeigen die konstitutive Expression des *rnpB* Gens, während die *ocp*- und *sodB*-Expression in den unteren Reihen dargestellt ist. Die Kontrolle zeigt die cDNA-Menge dieser Gene aus Zellen vor der Stressbehandlung.

Neben der Verifizierung, dass bereits bekannte Licht- bzw. Sauerstoffstressgene sich in *Nodularia* CCY9414 wie erwartet verhalten haben, lag der Fokus dieser Arbeit auf der Analyse von Genen des photorespiratorischen Stoffwechsels. In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass bei diesen Genen die Expressionsveränderungen deutlich geringer ausfallen als bei den Indikatorgenen. Die Phosphoglykolatphosphatase (PGLP, EAW43743) zeigt eine leicht verstärkte Expression bei erhöhten Sauerstoffkonzentrationen als auch in der ersten halben Stunde der Lichtstressreaktion. Das T-Protein (EAW44899) und die Glyceratkinase (EAW43474) weisen eine Erhöhung der Expressionsraten mit Dauer der Starklichtphase sowie bei der Kombination mit Sauerstoff in den ersten 30 Minuten auf. Eine verstärkte Expression des L-Proteins (EAW44961) ist ausschließlich unter Sauerstoffstress zu beobachten. Insgesamt zeigen die Untersuchungen der Genexpressionsmuster, dass zumindest einige photorespiratorische Gene auf den Starklicht- bzw. Sauerstoffstress mit einer verstärkten Expression reagieren.

Erhebliche Veränderungen in den Expressionsmustern nach Licht- und Sauerstoffstress waren auch bei den Genen für das Chl-*a*-bindende Protein *isiA* sowie die Acetyl-CoA-Acetyltransferase *fadA* (EAW46340 bzw. EAW44752) zu beobachten. Diese Gene werden als Markergene für eine Eisenlimitierung angesehen. Mit der zunehmenden Dauer der jeweiligen Stresssituationen nahm die Expression beider Gene wieder deutlich ab (Abbildung 19).



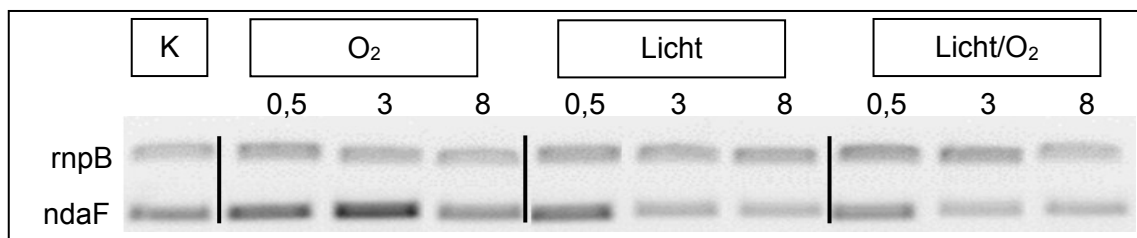
**Abbildung 18: RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung der Expressionsstärke photorespiratorischer Gene.** Die Expression der Phosphoglykolatphosphatase (*PGLP*), Glyceratkinase (*Glyk*), des T-Proteins (*T*) und L-Proteins (*L*) wurde in Zellen nach Exposition unter erhöhten Sauerstoffkonzentrationen ( $O_2$ , 40 %), unter Starklichtbedingungen (Licht, 1200  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) bzw. unter kombiniertem Starklicht-/Sauerstoffstress (Licht/ $O_2$ ) für unterschiedlich lange Zeiten (0,5; 3 bzw. 8 Stunden) untersucht. Die oberen Banden zeigen die konstitutive Expression des *rnpB* Gens, während die *PGLP*, *Glyk* sowie das T und L-Protein Genexpressionen in der unteren Reihe dargestellt sind. Die Kontrolle zeigt die cDNA-Menge dieser Gene aus Zellen vor der Stressbehandlung.



**Abbildung 19: RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung der *isiA* und *fadA* Expressionsstärke.** Die Expression des Photosystem II Chl-*a*-bindenden Protein und der Acetyl-CoA-acetyltransferase wurde in Zellen nach Exposition unter erhöhten Sauerstoffkonzentrationen ( $O_2$ , 40 %), unter Starklichtbedingungen (Licht, 1200  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) bzw. unter kombiniertem Starklicht-/Sauerstoffstress (Licht/ $O_2$ ) für unterschiedlich lange Zeiten (0,5; 3 bzw. 8 Stunden) untersucht. Die oberen Banden zeigen die konstitutive Expression des *rnpB* Gens, während die *isiA*-und *fadA*-Expression in den unteren Reihen dargestellt ist. Die Kontrolle zeigt die cDNA-Menge dieser Gene aus Zellen vor der Stressbehandlung.

### 3.4.4 Expression der Nodularin-Synthetase

*Nodularia* CCY9414 ist ein hepatotoxisches Cyanobakterium, das Nodularin bildet. Unter den hier gewählten Stressbedingungen, insbesondere unter Hoch-O<sub>2</sub>, wurde eine erhöhte Expression der Nodularin-Synthetase (*ndaF*, EAW45757) detektiert (Abbildung 20). Eine verstärkte Expression ist im Gelbild der RT-PCR nach einer halben Stunde für alle Stressbehandlungen zu beobachten. Bei alleiniger Sauerstoffbegasung ist eine stärkere Bandenfärbung in Bezug zur Kontrolle sogar über die gesamte Versuchslänge zu vermuten.



**Abbildung 20: RT-PCR zur semiquantitativen Bestimmung der *ndaF* Expressionsstärke.** Die Expression der Nodularin-Synthetase Untereinheit *ndaF* wurde in Zellen nach Exposition unter erhöhten Sauerstoffkonzentrationen (O<sub>2</sub>, 40 %), unter Starklichtbedingungen (Licht, 1200  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) bzw. unter kombiniertem Starklicht-/Sauerstoffstress (Licht/O<sub>2</sub>) für unterschiedlich lange Zeiten (0,5; 3 bzw. 8 Stunden) untersucht. Die oberen Banden zeigen die konstitutive Expression des *rnpB* Gens, während die *ndaF*-Expression in der unteren Reihe dargestellt ist. Die Kontrolle zeigt die cDNA-Menge des Gens aus Zellen vor der Stressbehandlung.

### 3.4.5 Globale Änderungen im Genexpressionsmuster durch RNAseq

Die RT-PCR erlaubt die semiquantitative Bestimmung von Expressionsänderungen ausgewählter Gene. Durch RNAseq wird dagegen eine „high throughput“ Sequenzierung von cDNA-Gemischen vorgenommen, die eine Quantifizierung des gesamten Transkriptoms erlaubt. Besonders interessant ist die Methode, wenn man bei Prokaryoten gleichzeitig eine Bestimmung von TSS (transcriptional start sites) mittels der RNAseq-Analyse vornimmt, sodass neben der Genexpressionsanalyse auch eine Promotorkartierung möglich ist (Mitschke et al., 2011 a, b). Aus Kostengründen wurde für das RNAseq Experiment die RNA von nur drei definierten Proben (Kontrolle, 0,5 h kombinierter Licht/O<sub>2</sub>- bzw. 3 h Licht-Stress) ausgewählt. Dabei fungierte die Vorkultivierung (Kontrolle) als standardisierter Bezugspunkt. Auf Grund der Ergebnisse der Aminosäureanalysen und der RT-PCR-Gelbilder

entschieden wir uns für die Proben von 0,5 h kombinierter Licht/O<sub>2</sub>- bzw. 3 h Lichtstress. Hier kam es zu extremen Veränderung bei den typischen Lichtstressgenen (Abbildung 17), aber auch bei Genen der Photorespiration (Abbildung 18) im Vergleich zur Kontrolle. Um eine qualitative Aussage in Bezug zum Expressionsmuster der RT-PCR herzustellen, wurden die RNAseq Transkriptmengen ins Verhältnis zur Kontrollprobe gesetzt. Die zweite Methode erlaubt eine quantitative Aussage über die Expressionsstärke, welche die visuelle Interpretation der RT-PCR Expressionsmuster verifiziert.

In den Tabellen 6 und 7 ist eine statistische Auswertung zum Anteil der TSS (Transkriptionsstartpunkte) mit veränderter Expression im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Berücksichtigt wurden nur TSS mit mindestens 3facher Zu- bzw. Abnahme der Expression. Hinsichtlich der TSS kommt es zur Unterscheidung von genspezifischen TSS (gTSS, bildet mRNAs), geninterne TSS (iTSS) und solcher, die in antisense-Richtung zum Gen liegen (aTSS). Genauere Klassifizierung siehe Voß et al. 2013.

Die Zahlen in Tabelle 6 verdeutlichen, dass es bei den gewählten Stressbedingungen zu starken Änderungen der Genexpressionsmuster kam. Sowohl bei 0,5 h kombiniertem Licht/O<sub>2</sub> mit 169 TSS als auch 3 h Lichtstress mit 99 TSS kam es zu erhöhten Expressionen vieler Gene. Dabei stellen die gTSS mit über 50 % und bei den 9fach erhöhten TSS mit 88 % die stärkste Gruppe dar. Bei einer ebenso großen Anzahl von TSS kam es zur Abnahme der Abundanz (Tabelle 7). Allerdings sind hier die Anteile mit 3facher Abnahme innerhalb der TSS ausgeglichener. Nur bei der Kombination 3 h Lichtstress mit 9facher Expressionsabnahme gegenüber der Kontrolle kann mit 87 % ein ebenso hoher Anteil an gTSS ermittelt werden.

**Tabelle 6: Globale Auswertung der RNAseq-Analysen.** Quantitative Bestimmung der Gene bzw. Transkriptionsstartpunkte (TSS), welche unter 0,5 h kombiniertem Licht/O<sub>2</sub> bzw. 3 h Lichtstress im Bezug zur Kontrolle eine erhöhte Genexpression aufwiesen.

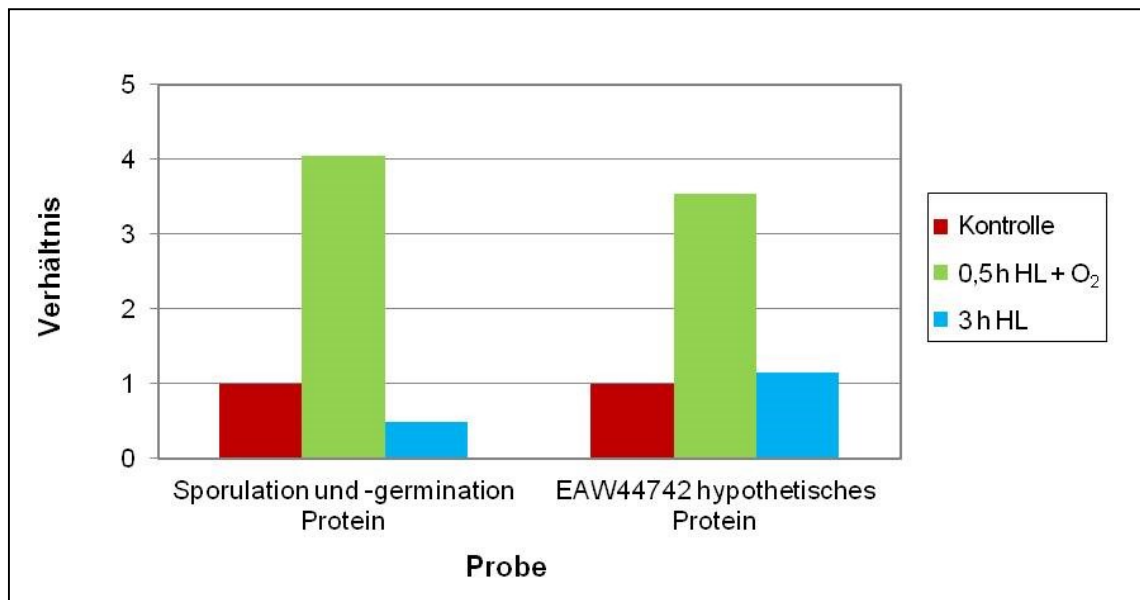
	Anzahl der TSS		Anteil in %	
	3 h HL	0,5 h HL + O <sub>2</sub>	3 h HL	0,5 h HL + O <sub>2</sub>
Kontrolle				
Summe 3fache Erhöhung	99	169		
gTSS	56	102	56,6	60,2
iTSS	24	38	24,2	22,5
aTSS	19	29	19,2	17,3
Summe 9fache Erhöhung	9	9		
gTSS	8	8	88,9	88,9
iTSS				
aTSS	1	1	11,1	11,1

**Tabelle 7: Globale Auswertung der RNAseq-Analysen.** Quantitative Bestimmung der Gene bzw. Transkriptionsstartpunkte (TSS), welche unter 0,5 h kombiniertem Licht/O<sub>2</sub> bzw. 3 h Lichtstress im Bezug zur Kontrolle eine verminderte Genexpression aufwiesen.

	Anzahl der TSS		Anteil in %	
	3 h HL	0,5 h HL + O <sub>2</sub>	3 h HL	0,5 h HL + O <sub>2</sub>
Kontrolle				
Summe 3fache Abnahme	101	81		
gTSS	44	22	43,6	27,2
iTSS	26	29	25,7	35,8
aTSS	31	30	30,7	37
Summe 9fache Abnahme	8	6		
gTSS	7	2	87,5	33,3
iTSS	1	3	12,5	50
aTSS		1		16,7

Mit Hilfe der RNAseq-Analysen konnte das Expressionsverhalten aller Gene von *Nodularia* CCY9414 unter den gewählten drei Bedingungen untersucht werden. Aus diesem umfangreichen Datensatz kann man sehr viele Schlüsse ziehen. Aus den Tabellen 6 und 7 ist zu entnehmen, dass über 100 Gene unter den jeweiligen Bedingungen mehr als 3fach induziert sind. Hierunter fallen viele Gene mit bekannter Funktion unter Starklicht- und Sauerstoffeinfluss als auch solche mit unbekannter Funktion (Tabelle 8).

Während in vielen Fällen die Gene sowohl bei kombiniertem Starklicht-/Sauerstoffstress als auch bei alleinigem Starklichtstress angeschaltet werden, wurden auch einige für den jeweiligen Stress spezifische Expressionsstimulationen gefunden. In Abbildung 21 sind Beispiele dargestellt, die zeigen, dass es bei der kombinierten Begasung mit Hoch-O<sub>2</sub> und gleichzeitigem Starklichtstress zu einer verstärkten Expression im Gen für die Sporulation (EAW44688) kommt. Auch bei dem nicht-charakterisierten aber hochkonservierten „hypothetical protein“ (EAW44742) ist eine deutliche Zunahme unter diesen Bedingungen zu beobachten. Bei beiden Genen wird eine mehr als 3fache Expression gegenüber der Kontrolle und dem 3 h Starklichtstress erreicht. Zur Annotierung dieser und folgender Gene wurden Blast-Analysen durchgeführt (Tabelle 2).



**Abbildung 21: Relative Expression von spezifisch Sauerstoff-beeinflussten Genen nach Starklicht- und Sauerstoffstress.** Die Abundanz von cDNAs („Reads“) des Sporulation- und Germination-Proteins und des hypothetischen Proteins wurde unter kombinierten Starklicht- und erhöhten Sauerstoffkonzentrationen für 30 min bzw. nur Starklichtstress für 3 h mit den Kontrollwerten (auf 1 normalisiert) verglichen. Kontrolle – Kultivierung unter Standardbedingungen, 0,5 h HL+O<sub>2</sub> – 30 Minuten kombinierter Starklicht/O<sub>2</sub>-Stress, 3 h – 3 Stunden Starklichtstress.

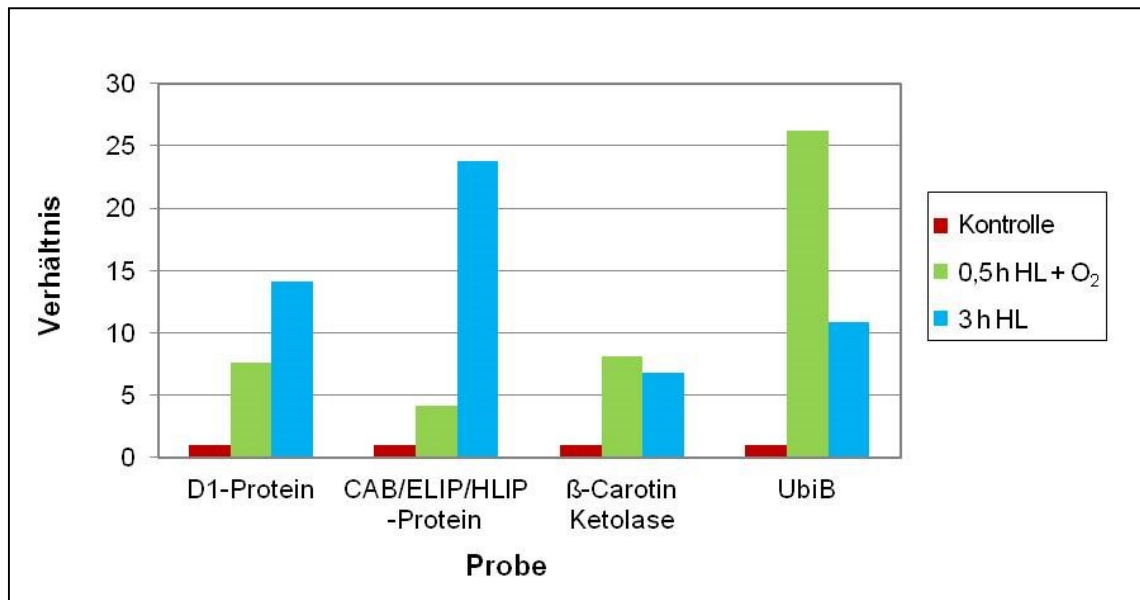
Dass der Starklichtstress sowohl allein als auch in Kombination mit Sauerstoff eine Vielzahl von Genen induziert, ist in Tabelle 8 aufgeführt. Dargestellt sind Gene, welche ein großes Verhältnis an Expression zur Kontrolle aufweisen.

**Tabelle 8: Top 25 der lichtinduzierten gTSS.** Licht- und Sauerstoff-induzierte Gene im Verhältnis zur Kontrolle (Standardkultivierung). Sortiert wurde absteigend nach dem 3 Stunden Starklichtverhältnis. Aufgeführt sind die Blastp-Analyse sowie deren Genannotation gegen die NCBI-Datenbank. Hellgraue Kästchen: Gene, die graphisch analysiert wurden; Dunkelgraue Kästchen: Gene, bei denen die Expression auch mit RT-PCR durchgeführt wurde.

Top gTSS	Protein in <i>Nodularia</i> CCY9414	Verhältnis Kontrolle	Verhältnis 0,5 h HL + O <sub>2</sub>	Verhältnis 3 h HL	Annotation
1	EAW43971	1	4,1	23,8	CAB/ELIP/HLIP superfamily protein
2	EAW45498	1	37,9	19,3	NADH dehydrogenase I subunit 4, Involved in photosystem-1 cyclic electron flow
3	EAW44049	1	7,6	14,1	photosystem II protein D1 (PsbA)
4	EAW42854	1	26,2	10,8	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase UbiB
5	EAW43481	1	2,1	10,2	Phycobilisome degradation protein NblA
6	EAW44195	1	7,4	9,8	Adenosine deaminase
7	EAW42864	1	19,6	9,2	unknown protein; detected as OCP
8	EAW42795	1	14,2	8,0	Phycoerythrin linker protein CpeS homolog
9	EAW43072	1	8,1	6,8	Beta-carotene ketolase
10	EAW44217	1	3,1	6,4	CAB/ELIP/HLIP superfamily protein
11	EAW44124	1	2,4	6,1	Ribose-phosphate pyrophosphokinase
12	EAW43350	1	5,4	6,1	CAB/ELIP/HLIP superfamily protein
13	EAW46645	1	11,8	6,0	Solanesyl diphosphate synthase
14	EAW45447	1	12,0	5,8	recombination protein RecR
15	EAW46912	1	8,7	5,7	CAB/ELIP/HLIP superfamily protein
16	EAW45389	1	2,8	5,7	Translation elongation factor G
17	EAW44049	1	6,9	5,5	photosystem II protein D1 (PsbA)
18	EAW45715	1	2,8	5,4	Superoxide dismutase [Fe]
19	EAW43756	1	3,5	5,4	GTP cyclohydrolase I
20	EAW45598	1	3,3	5,3	CopG family transcriptional regulator
21	EAW45206	1	4,8	5,3	serine/threonine kinase
22	EAW46312	1	57,4	5,2	light-harvesting-like protein
23	EAW47248	1	2,3	4,8	Ribosomal protein L11 methyltransferase
24	EAW43200	1	5,2	4,8	Chaperone protein DnaJ
25	EAW43858	1	4,5	4,5	Hypothetical protein; detected as iron-sulfur cluster-binding protein

Zur Überprüfung der Qualität der Daten wurden zunächst die Expressionsänderungen sogenannter „Indikator-Gene“ für Starklicht- und Sauerstoffstress, die z.B. für das D1-Protein (PsbA), die  $\beta$ -Carotinketolase, Ubichinon-Monooxygenase oder Gene der CAB/ELIP/HLIP-Superfamilie kodieren, betrachtet (Abbildung 22). Die Spitze der in

Tabelle 8 aufgeführten Werte zeigt, wie zu erwarten, dass diese Gene eine 4-15fache Zunahme im mRNA-Gehalt sowohl nach Starklicht- als auch nach kombiniertem Starklicht-/Sauerstoffstress haben.

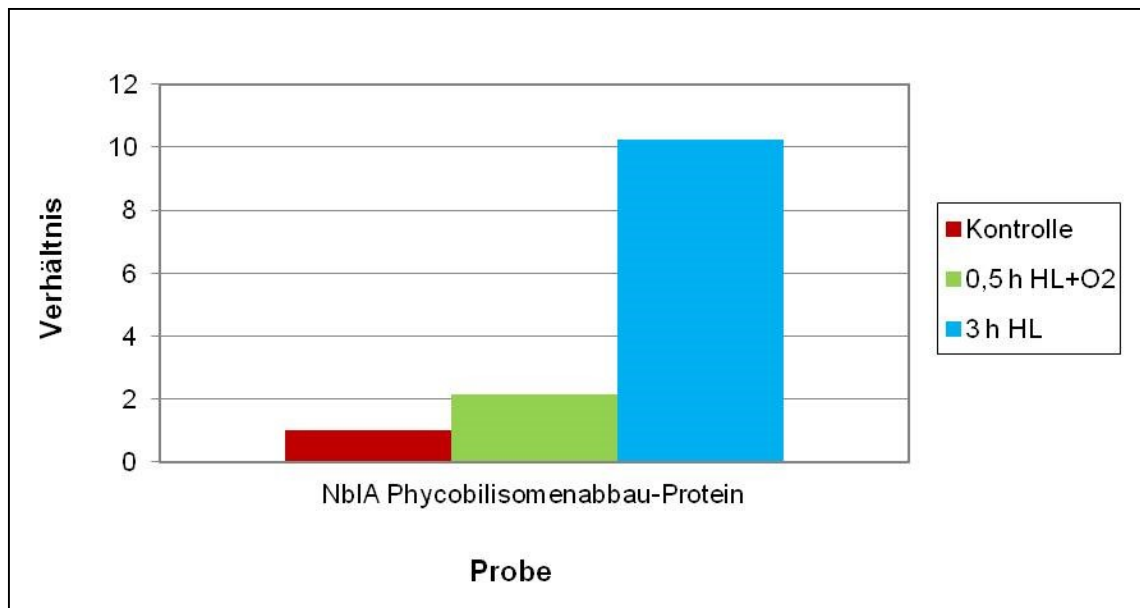


**Abbildung 22: Relative Expression von ausgewählten Genen in *Nodularia* CCY9414, die bekannte Proteine nach Starklicht- und Sauerstoffstress kodieren.** Die Abundanz von cDNAs („Reads“) verschiedener Gene D1-Protein (EAW44049), CAB/ELIP/HLIP-Protein (EAW43971), β-Carotin-Ketolase (EAW43072) und UbiB (EAW42854) wurde unter kombinierten Starklicht- und erhöhten Sauerstoffkonzentrationen für 30 min bzw. nur Starklichtstress für 3 h mit den Kontrollwerten (auf 1 normalisiert) verglichen. (Kontrolle – Kultivierung unter Standardbedingungen, 0,5 h HL+O<sub>2</sub> – 30 Minuten kombinierter Starklicht/O<sub>2</sub>-Stress, 3 h – 3 h Starklichtstress).

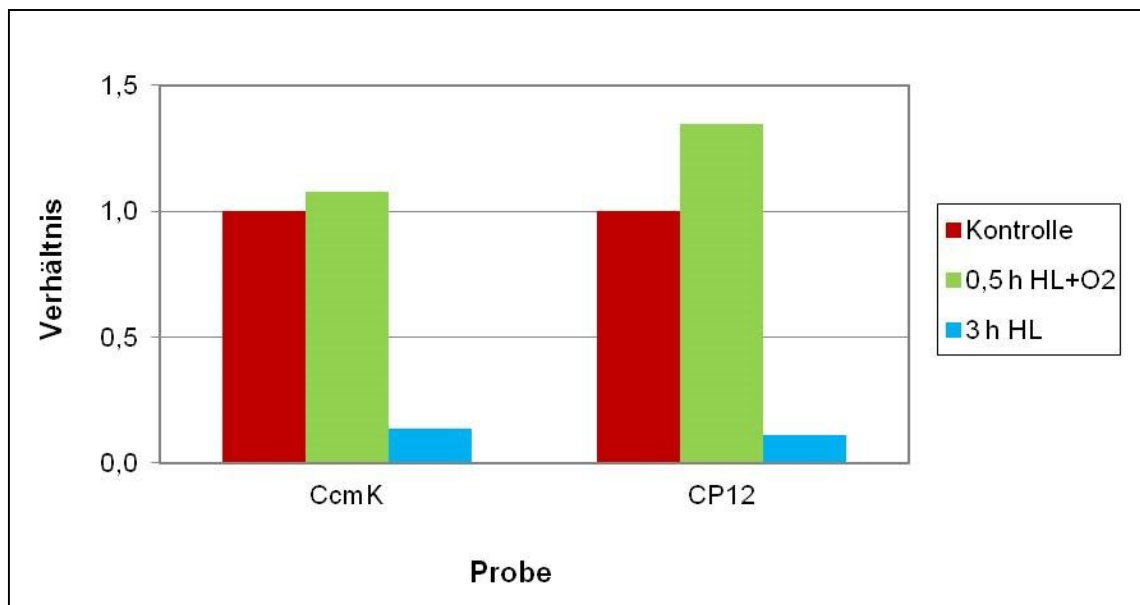
In Abbildung 23 ist die Expression des Gens für das am Phycobilisomenabbau beteiligten Protein NblA (EAW43481) dargestellt, welches besonders nach Starklichteinfluss eine verstärkte Expression (10fach) im Vergleich zur Kontrolle und zur kombinierten Begasung mit Hoch-O<sub>2</sub> aufweist.

Unter Starklichteinfluss kommt es auch zu einer extremen Verminderung der Expression vieler Gene (Abbildung 24). Zum Beispiel haben die Gene CcmK3 (EAW46673) und CP12 (EAW43734) ein bis zu 9fach vermindertes Expressionsniveau gegenüber der Kontrolle und zur kombinierten Begasung mit Hoch-O<sub>2</sub> nach 30 Minuten. Das Protein CcmK3 ist an der Kohlenstoffkonzentrierung beteiligt und das Protein CP12 fungiert bei der Regulation des Calvin-Zyklus.



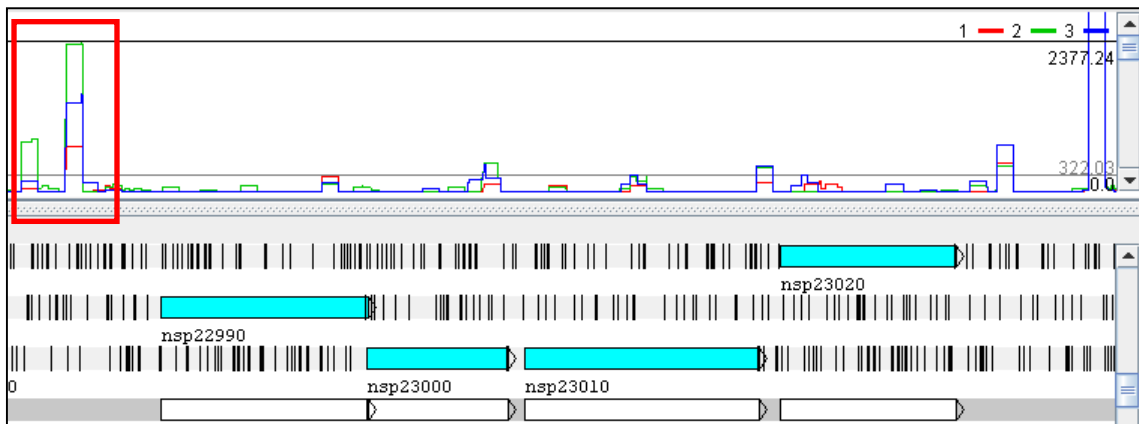


**Abbildung 23: Relative Expression von Starklicht-beeinflussten Genen für Starklicht- und Sauerstoffstress.** Die Abundanz von cDNAs („Reads“) des Phycobilisomenabbau-Proteins NblA wurde unter kombinierten Starklicht- und erhöhten Sauerstoffkonzentrationen für 30 min bzw. nur Starklichtstress für 3 h mit den Kontrollwerten (auf 1 normalisiert) verglichen. Kontrolle – Kultivierung unter Standardbedingungen, 0,5 h HL+O<sub>2</sub> – 30 Minuten kombinierter Starklicht/O<sub>2</sub>-Stress, 3 h – 3 h Starklichtstress.

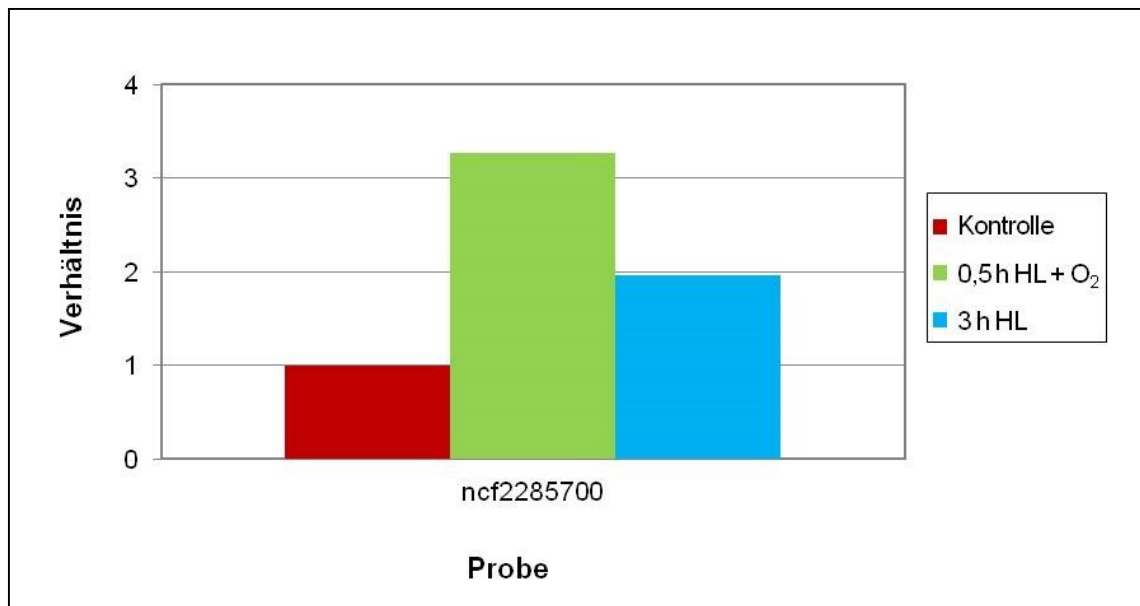


**Abbildung 24: Relative Expression von Starklicht-beeinflussten Genen nach Starklicht- und Sauerstoffstress.** Die Abundanz von cDNAs („Reads“) des am Kohlenstoffdioxidkonzentrierungsmechanismus beteiligten Proteins CcmK3 und des an der Regulation des Calvinzyklus beteiligten Proteins CP12 wurde unter kombinierten Starklicht- und erhöhten Sauerstoffkonzentrationen für 30 min bzw. nur Starklichtstress für 3 h mit den Kontrollwerten (auf 1 normalisiert) verglichen. Kontrolle – Kultivierung unter Standardbedingungen, 0,5 h HL+O<sub>2</sub> – 30 Minuten kombinierter Starklicht/O<sub>2</sub>-Stress, 3 h – 3 h Starklichtstress.

Mit Hilfe von Blastp-Analysen (siehe 3.1) konnten Gene für die Biosynthese des Mycosporins Shinorin im *Nodularia* CCY9414 Genom annotiert werden. Für die Blastp-Analysen wurden gut untersuchte Gene eines Mycosporin-Clusters aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 genommen (Gao und Garcia-Pichel, 2011). Die Transkriptmengen brachten keine signifikanten TSS im Mycosporin-Cluster hervor. Jedoch ermöglichte eine Analyse mit dem Artemis-Programm die Detektion eines TSS (ncf2285700), welcher unmittelbar im Bereich vor dem Cluster in 5'-3' Richtung liegt (Abbildung 25). Bei der relativen Expression dieses TSS (Abbildung 26) ist eine 3fache Erhöhung nach 30 Minuten kombiniertem Starklicht/O<sub>2</sub>-Stress zu beobachten. Nach 3 Stunden Starklicht ist das Verhältnis, in Bezug auf die Expression der Kontrolle nur noch doppelt so stark.

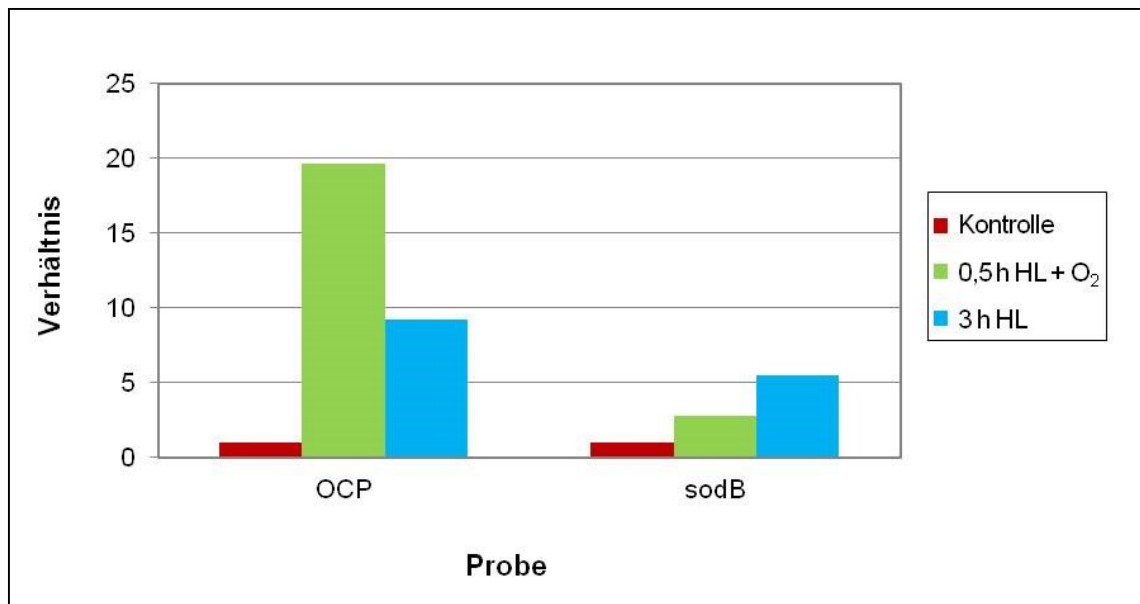


**Abbildung 25: Screenshot des Artemis-Reads-Diagramm des Mycosporin-Clusters.** Rotes Quadrat auf der linken Seite markiert den TSS; rechte Seite zeigt die detektierte Abundanz von cDNA („Reads“). Roter Peak – Kontrolle (Kultivierung unter Standardbedingungen), grüner Peak – 30 Minuten kombinierter Starklicht/O<sub>2</sub>-Stress, blauer Peak – 3 h Starklichtstress. Clusteruntereinheiten: nsp22990 – Dimethyl 4 desoxygadusol synthase, nsp2300 – O-Methyltransferase, nsp23010 – C-N-ligase und nsp23020 – D-alanin-D-alanin ligase.

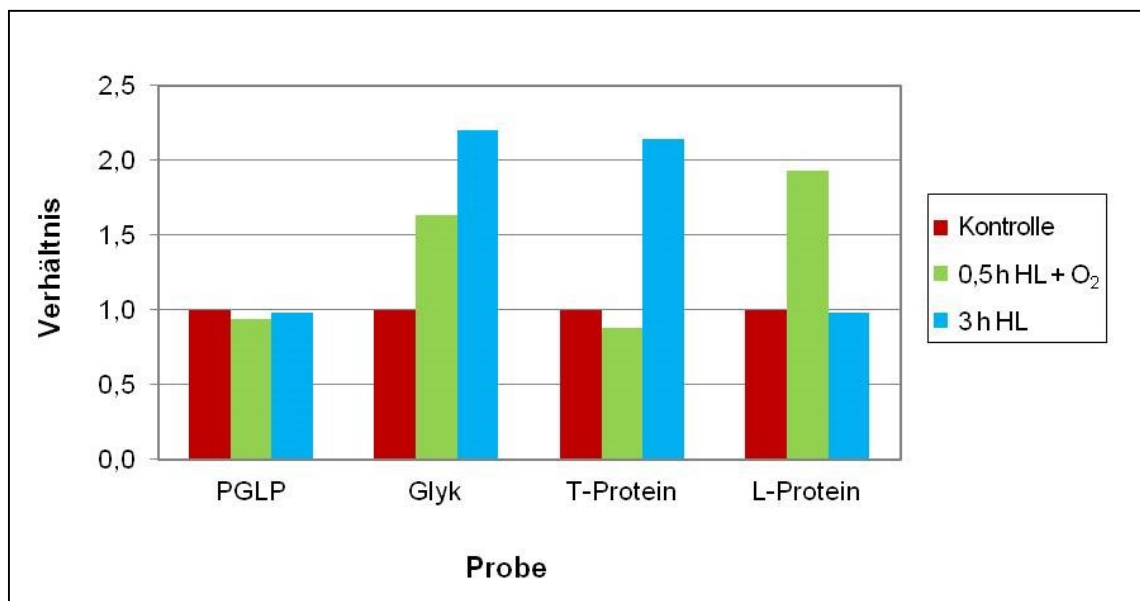


**Abbildung 26: Relative Expression von *ncf2285700* nach Starklicht- und Sauerstoffstress.** Die Abundanz von cDNAs („Reads“) des Transkriptionsstarts (*ncf2285700*) des Mycosporin-Cluster wurde unter kombinierten Starklicht- und erhöhten Sauerstoffkonzentrationen für 30 min bzw. nur Starklichtstress für 3 h mit den Kontrollwerten (auf 1 normalisiert) verglichen. Kontrolle – Kultivierung unter Standardbedingungen, 0,5 h HL+O<sub>2</sub> – 30 Minuten kombinierter Starklicht/O<sub>2</sub>-Stress, 3 h – 3 h Starklichtstress.

Weitere wichtige Indikorgene für Lichtstress stellen das Orange-Carotin-Protein (*ocp*, EAW42864) und die Superoxid-Dismutase (*sodB*, EAW45715) dar. Deren Expression wurde sowohl durch RT-PCR (Abbildung 17) als auch RNAseq (Abbildung 27) miteinander verglichen. Bei der RT-PCR wurden eindeutig verstärkte Banden für *ocp* mit cDNA der Proben unter Licht- bzw. Sauerstoffstress im Agarosegel im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Dies lässt auf eine erhöhte Expression unter den Stressbedingungen schließen und wird durch die RNAseq-Daten unterstützt. Während bei den separat licht- bzw. sauerstoffgestressten Zellen von *Nodularia* CCY9414 die höchste *ocp*-Expression zum frühesten Zeitpunkt (30 min) gefunden wurde, bleibt die *ocp*-Expression bei kombiniertem Starklicht- und Sauerstoffstress über den gesamten Untersuchungszeitraum erhöht (Abbildung 27). Die Kombination von Licht- und Sauerstoffstress führt zu einer fast 20fachen Erhöhung der *ocp*-Expression gegenüber der Kontrolle im RNAseq Experiment (Abbildung 27) und erklärt die deutlich intensivere Bandenfärbung im Agarosegel. Im Agarosegel für die *sodB* Expression (Abbildung 17) war eine stärkere Bandenfärbung unter Starklichtstress zu beobachten. Verglichen zur Kontrolle gab es die höchste Expression nach 3 Stunden Starklichtstress, was durch die RNAseq-Daten (Abbildung 27) mit einer mehr als 5fachen Erhöhung unterstrichen wird.



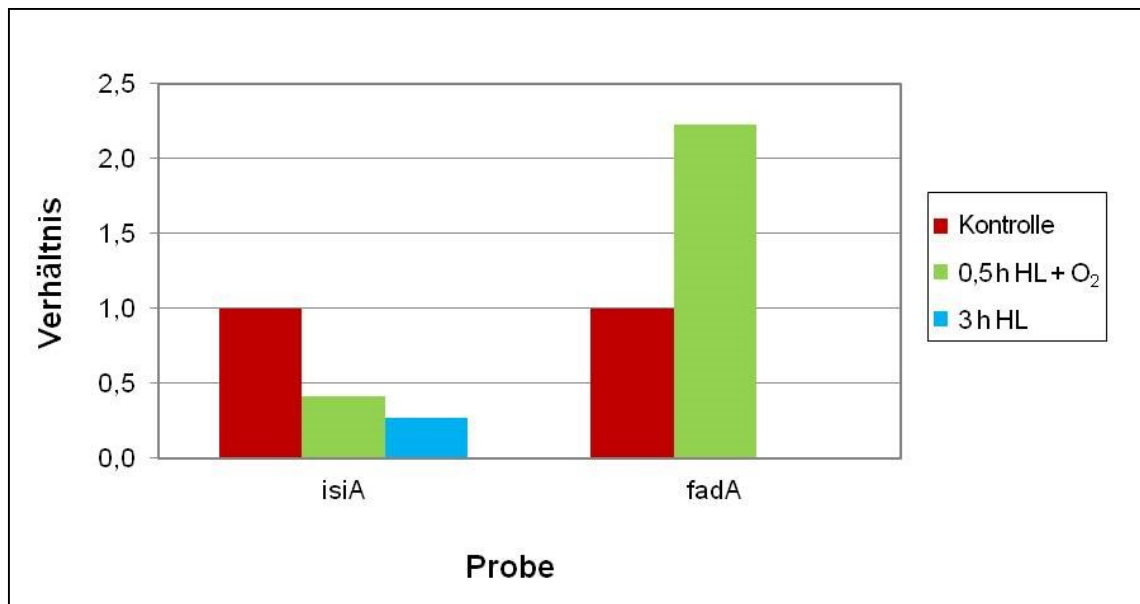
**Abbildung 27: Relative Expression von *ocp* und *sodB* für Starklicht- und Sauerstoffstress.** Die Abundanz von cDNAs („Reads“) der Gene für das Orange-Carotin-Protein bzw. die Superoxid-Dismutase wurde unter kombinierten Starklicht- und erhöhten Sauerstoffkonzentrationen für 30 min bzw. nur Starklichtstress für 3 h mit den Kontrollwerten (auf 1 normalisiert) verglichen. Kontrolle – Kultivierung unter Standardbedingungen, 0,5 h HL+O<sub>2</sub> – 30 Minuten kombinierter Starklicht/O<sub>2</sub>-Stress, 3 h – 3 h Starklichtstress.



**Abbildung 28: Relative Expression photorespiratorischer Gene nach Starklicht- und Sauerstoffstress.** Die Abundanz von cDNAs („Reads“) verschiedener Gene Phosphoglykolatphosphatase (PGLP), Glyceratkinase (Glyk), T- und L-Protein wurden unter kombinierten Starklicht- und erhöhten Sauerstoffkonzentrationen für 30 min bzw. nur Starklichtstress für 3 h mit den Kontrollwerten (auf 1 normalisiert) verglichen. Kontrolle – Kultivierung unter Standardbedingungen, 0,5 h HL+O<sub>2</sub> – 30 Minuten kombinierter Starklicht/O<sub>2</sub>-Stress, 3 h – 3 h Starklichtstress.

In dem Agarosegelbild der RT-PCR ist zu erkennen, dass die Expressionsveränderungen bei den Genen der Photorespiration deutlich geringer ausfallen als bei den Indikatorgenen. Im RNAseq-Experiment wurde maximal eine Verdopplung der Expressionshöhe unter den Stressbedingungen im Vergleich zur Kontrolle detektiert (Abbildung 28). Damit stimmen auch bei diesen Genen die Unterschiede in den Expressionsmustern nach RT-PCR und RNAseq relativ gut überein. Am Beispiel der Gene für die Glyceratkinase und das L-Protein ist diese Übereinstimmung zwischen der RT-PCR und den RNAseq-Analysen sehr deutlich. Die starke Zunahme der Glyceratkinase mRNA mit Dauer der Starklichtphase als auch bei der Kombination mit Sauerstoff in den ersten 30 Minuten wird bei den cDNA-reads im RNAseq Experiment deutlich. Die Expression des L-Proteins unter erhöhten Sauerstoffkonzentrationen ist im RNAseq-Experiment etwa verdoppelt und bestätigt die verstärkte Bande in der RT-PCR. Die Abundanz der cDNAs der Phosphoglykolatphosphatase (EAW43743) zeigen keine Unterschiede im RNAseq, welches die kaum erkennbaren Unterschiede der Banden im RT-PCR-Bild widerspiegelt. Das T-Protein weist eine Erhöhung der Expressionsrate mit Dauer der Starklichtphase in den RNAseq-Daten auf. Die verstärkte Expression bei der Kombination mit Sauerstoff in den ersten 30 Minuten bei der RT-PCR konnte durch RNAseq allerdings nicht bestätigt werden.

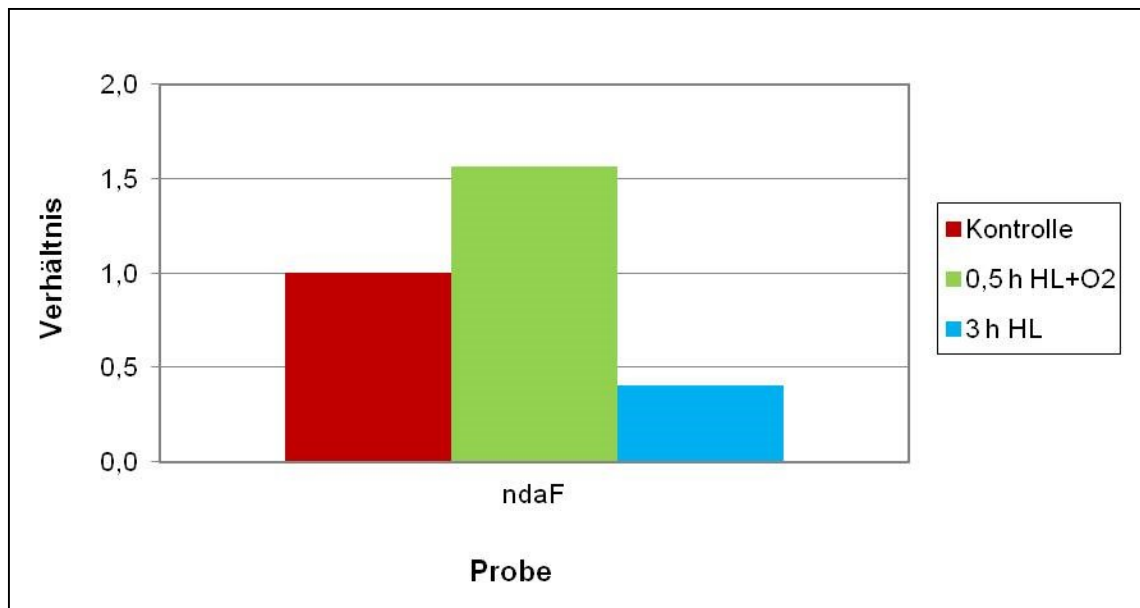
Insgesamt zeigen die Untersuchungen der Genexpressionsmuster, dass zumindest einige photorespiratorische Gene auf den Starklicht- bzw. Sauerstoffstress mit einer verstärkten Expression reagieren.



**Abbildung 29: Relative Expression von *isiA* und *fadA* für Starklicht- und Sauerstoffstress.** Die Abundanz von cDNAs („Reads“) des Photosystem II Chl *a* bindenden Proteins und der Acetyl-CoA-acetyltransferase wurde unter kombinierten Starklicht- und erhöhten Sauerstoffkonzentrationen für 30 min bzw. nur Starklichtstress für 3 h mit den Kontrollwerten (auf 1 normalisiert) verglichen. Kontrolle – Kultivierung unter Standardbedingungen, 0,5 h HL+O<sub>2</sub> – 30 Minuten kombinierter Starklicht/O<sub>2</sub>-Stress, 3 h – 3 h Starklichtstress. Reads für *fadA* lagen bei 3 h HL unter dem Detektionsbereich.

Auch bei den eisenregulierten Genen *isiA* bzw. *fad* wurde die Übereinstimmung zwischen RT-PCR und RNAseq festgestellt. In der RT-PCR nahm die Expression beider Gene mit zunehmender Dauer der jeweiligen Stresssituationen wieder deutlich ab (Abbildung 19). Deckungsgleich zeigen RT-PCR und RNAseq-Analysen, dass die mRNA-Menge für *fadA* in der ersten Phase des Stressses stark ansteigt (Abbildung 29). Allerdings konnte hier auf Grund einer zu geringen Transkriptmenge für 3 Stunden Starklichteinfluss kein Wert detektiert werden. Die schon bei der RT-PCR beobachtete Expressionsabnahme mit zunehmender Stressdauer wird für *isiA* durch das RNAseq-Experiment mit den beiden Zeitpunkten 0,5 und 3 Stunden unterstrichen.

Die Expressionsmuster des Gens für die Nodularin-Synthetase Untereinheit *ndaF* konnten mit Hilfe der RNAseq-Methode verifiziert werden. Der visuelle Eindruck einer verstärkten Expression nach erhöhtem Sauerstoffeinfluss konnte durch die drei Analysepunkte des RNAseq-Experiments bestätigt werden. Auch hier wird eine erhöhte mRNA-Abundanz in der Probe nach 30 Minuten kombiniertem Starklicht- und Sauerstoffstress, im Verhältnis zur Kontrolle und nach 3stündiger Starklichtbehandlung, detektiert (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Relative Expression von *ndaF* nach Starklicht- und Sauerstoffstress.** Die Abundanz von cDNAs („Reads“) der Nodularin Synthetase Untereinheit *ndaF* wurde unter kombinierten Starklicht- und erhöhten Sauerstoffkonzentrationen für 30 min bzw. nur Starklichtstress für 3 h mit den Kontrollwerten (auf 1 normalisiert) verglichen. Kontrolle – Kultivierung unter Standardbedingungen, 0,5 h HL+O<sub>2</sub> – 30 Minuten kombinierter Starklicht/O<sub>2</sub>-Stress, 3 h – 3 h Starklichtstress.

### 3.5 Phosphatmangel

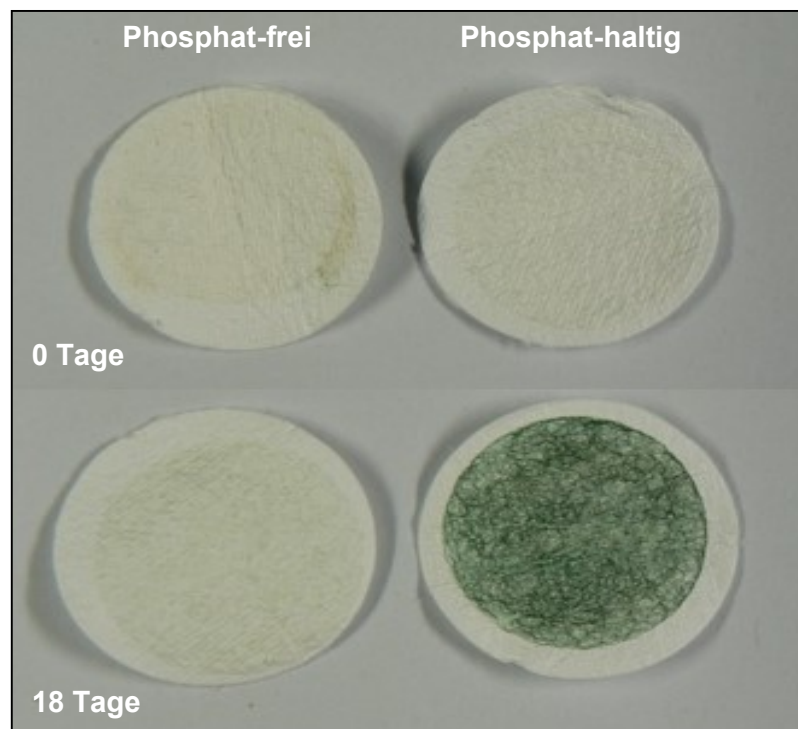
#### 3.5.1 Versuchsdurchführung

Phosphatmangel ist einer der am meisten diskutierten Faktoren, der die Blüte von *Nodularia* in der Ostsee induzieren soll. Daher wurde die molekulare Anpassungsstrategie von *Nodularia* CCY9414 an Phosphatlimitation, wie sie im Spätsommer auch in der Ostsee vorzufinden ist, untersucht. Für dieses Experiment wurden Zellen aus einer zwei Wochen alten Kultur (siehe Standardkultivierung 3.1.) mit N-haltigem bzw. N-freiem Medium geteilt und mit jeweils P-freiem Medium (ohne  $K_2HPO_4$ ) bzw. P-haltigem Medium (mit  $K_2HPO_4$ ) weiter kultiviert. Beim Ansatz der P-freien Kultivierung wurde das angeimpfte Zellmaterial über einen Filter (Whatman GF/F) gezogen und einmal mit dem jeweiligen P-freiem Medium gespült. Die Probenentnahme erfolgte über 18 Tage in definierten Abständen und zu einem festen Zeitpunkt um 14 Uhr.

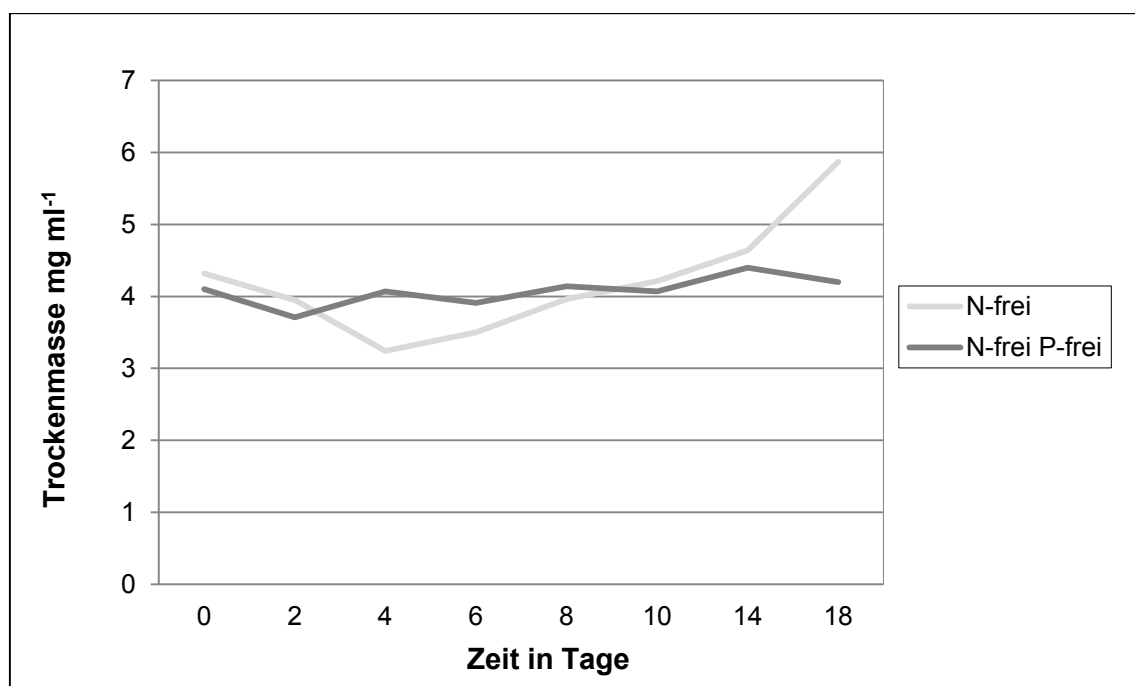
#### 3.5.2 Wachstum als Trockenmasseveränderung

Anhand der Trockenmassebestimmung ist sowohl visuell (Abbildung 31) als auch quantitativ (Abbildung 32) zu erkennen, dass der Phosphatmangel im Medium zu einer Limitierung des Wachstums führt. Bei der Gewichtsbestimmung der Trockenmasse nach 10 Tagen, ist ein deutlicher Anstieg der P-haltigen Kultur gegenüber der P-freien zu beobachten. Dies deckte sich mit der fotografischen Dokumentation, bei der eine verstärkte Grünfärbung der Filter nach Tag 18 deutlich zu beobachten war.





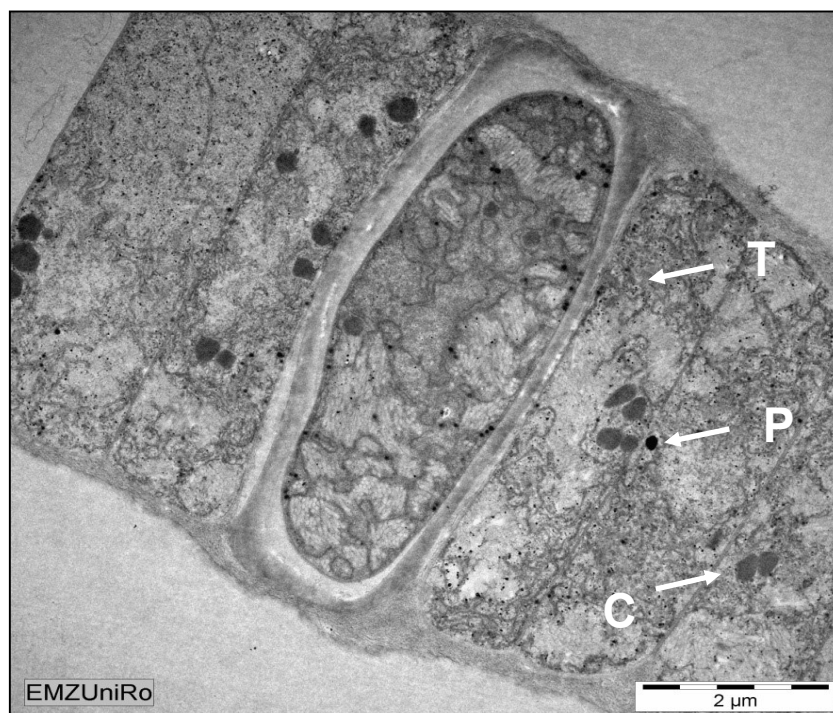
**Abbildung 31: Fotografische Dokumentation der Veränderungen in der Trockenmasse.** Dargestellt sind die Trockenmassefilter von Tag 0 und 18. Links: Filter der P-freien Kultivierung. Rechts: Filter der P-haltigen Kultivierung. Bei den Filtern der P-haltigen Kultivierung in der unteren Reihe ist eine deutliche Zunahme der Biomasse anhand der zunehmenden Grünfärbung zu erkennen.



**Abbildung 32: Zunahme der Trockenmasse im Phosphatmangelversuch über 18 Tage.** Helle Linie: Kultivierung mit Phosphat-haltigem Medium; Dunkle Linie: Kultivierung ohne Phosphat. Beide Kulturen wurden im Nitrat-freien Medium angezogen.

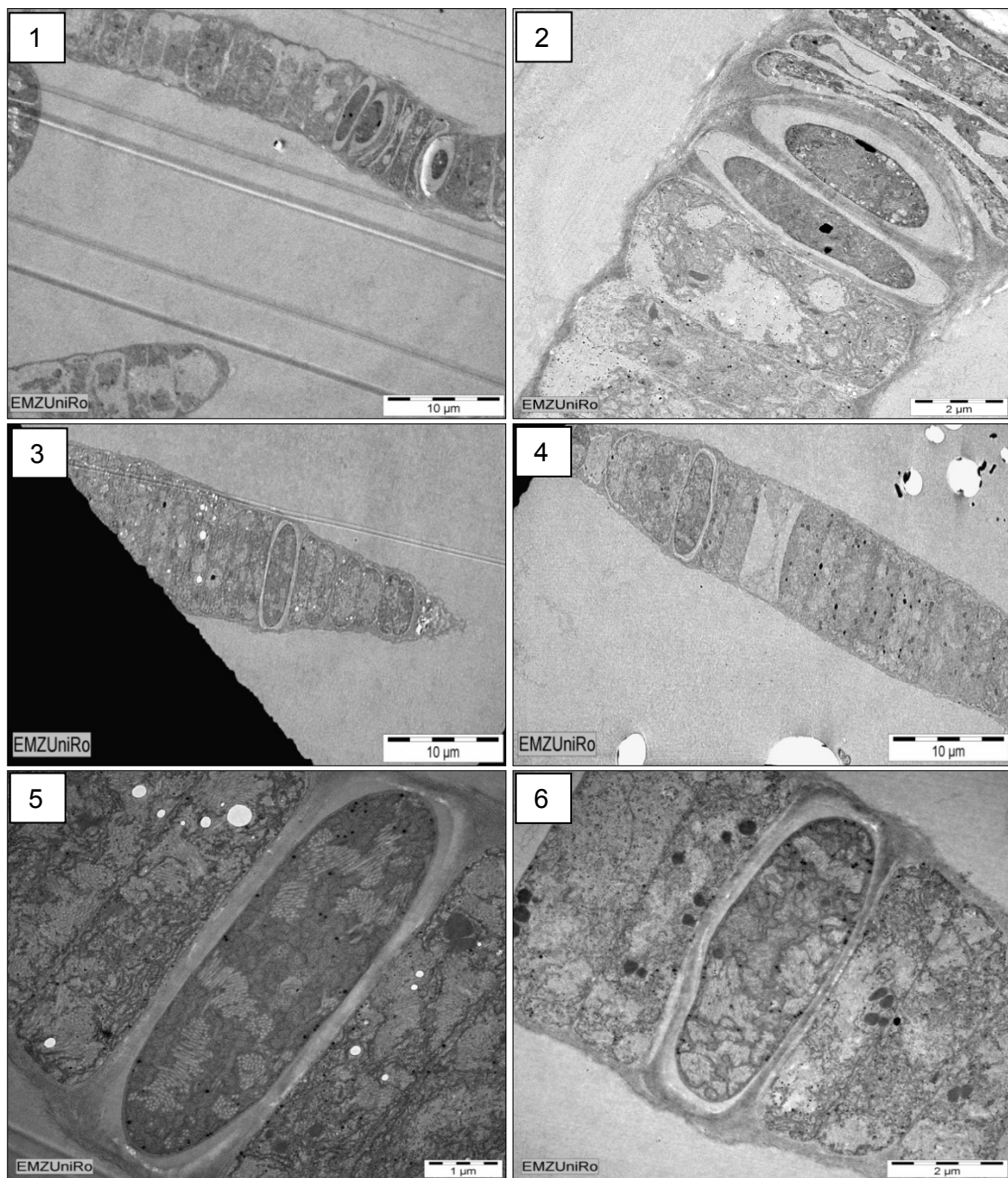
### 3.5.3 Nachweis von Polyphosphaten durch Elektronenmikroskopie

Eine der wichtigsten Anpassungen an den Phosphatmangel besteht in der Akkumulation bzw. Mobilisierung von Polyphosphaten. Mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) sollten polyP-Granula in den Zellen von *Nodularia* CCY9414 sichtbar gemacht werden (Abbildung 33). Neben den dunklen Einschlusskörpern, die vermutlich polyP-Granula darstellen, sind auch Carboxysomen, Thylakoide, Gasvakuolen, Zellwände und andere Strukturen deutlich zu erkennen.

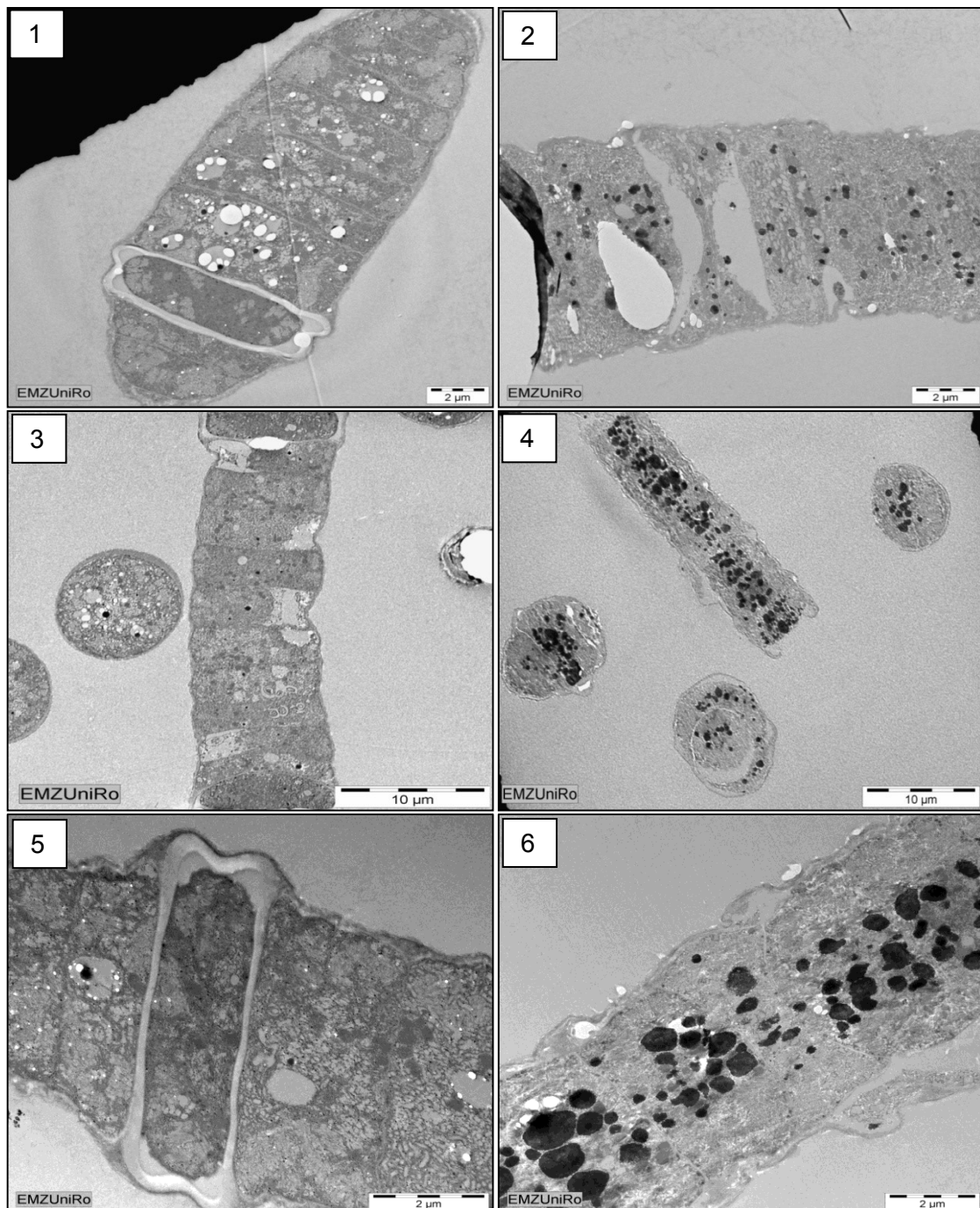


**Abbildung 33: Aufnahme eines *Nodularia* CCY9414 Filaments mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).** Zentral ist eine Heterocyste abgebildet. Zelluläre Strukturen sind erklärt. P- Polyphosphat, T – Thylakoid, C –Carboxysom.

Es wurden mikroskopische Untersuchungen hinsichtlich der Präsenz von Polyphosphaten an Zellen vorgenommen, die zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 4, 10 und 18 Tage) aus einer Phosphat-haltigen bzw. -freien Kultur entnommen wurden (Abbildung 34 und 35).



**Abbildung 34: TEM-Aufnahmen von *Nodularia* CCY9414-Fäden nach 0 und 4 Tagen Anzucht.** Die Bilder 1 und 2 zeigen Zellen der Ausgangskultur mit einem P-haltigen Medium. Die Bilder 3 bis 6 stammen von Filamenten nach 4 Tagen Kultivierung. Rechts: Kultivierung in P-freiem Medium Links: Kultivierung in P-haltigem Medium.

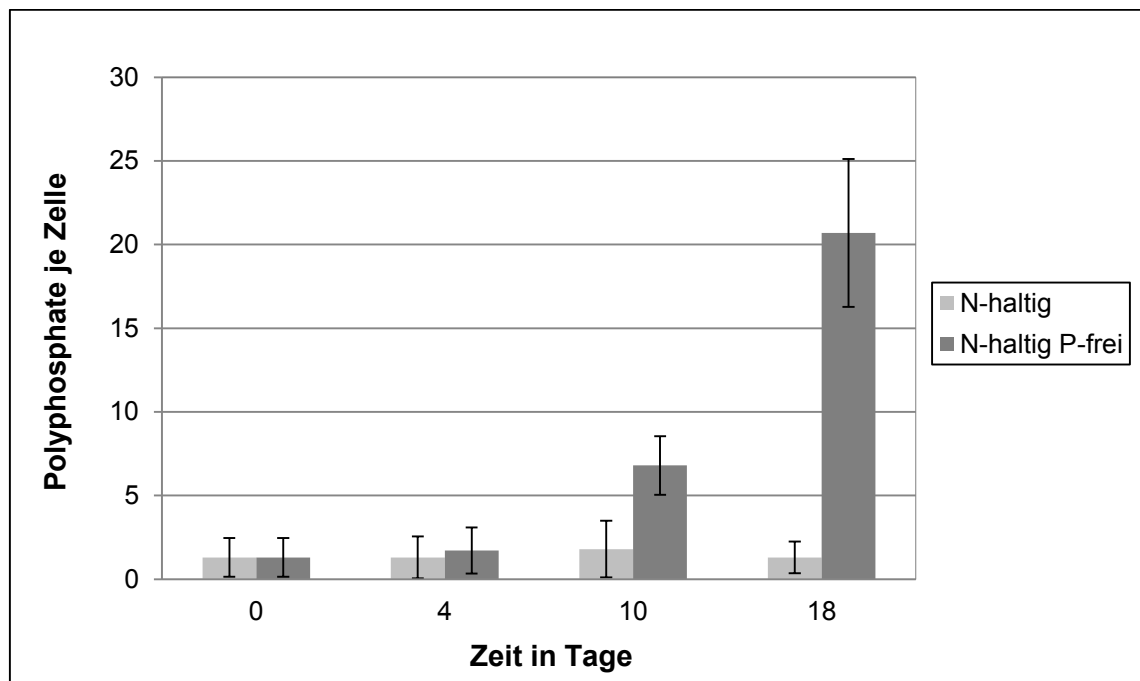


**Abbildung 35: Mikroskopische Aufnahmen von *Nodularia* CCY9414-Fäden (TEM) nach 10 und 18 Tagen Anzucht.** Die Bilder 1 und 2 stellen Zellen nach 10 Tagen Kultivierung dar. Es war eine verstärkte Akkumulation von Polyphosphaten unter Kultivierung in P-freiem Medium (Bild 2) in Bezug zur Kultivierung mit Phosphat (Bild 1) zu beobachten. Die Bilder 3 bis 6 stammen von Filamenten nach 18 Tagen Kultivierung. Bei der Kultivierung in P-freiem Medium (Bilder 4 und 6 mit unterschiedlichen Vergrößerungen) kommt es zu einer extremen Akkumulation von Polyphosphaten. Bei der Kultivierung in P-haltigem Medium (Bilder 3 und 5 mit unterschiedlichen Vergrößerungen) sammeln sich in den Zellen keine Polyphosphate an.

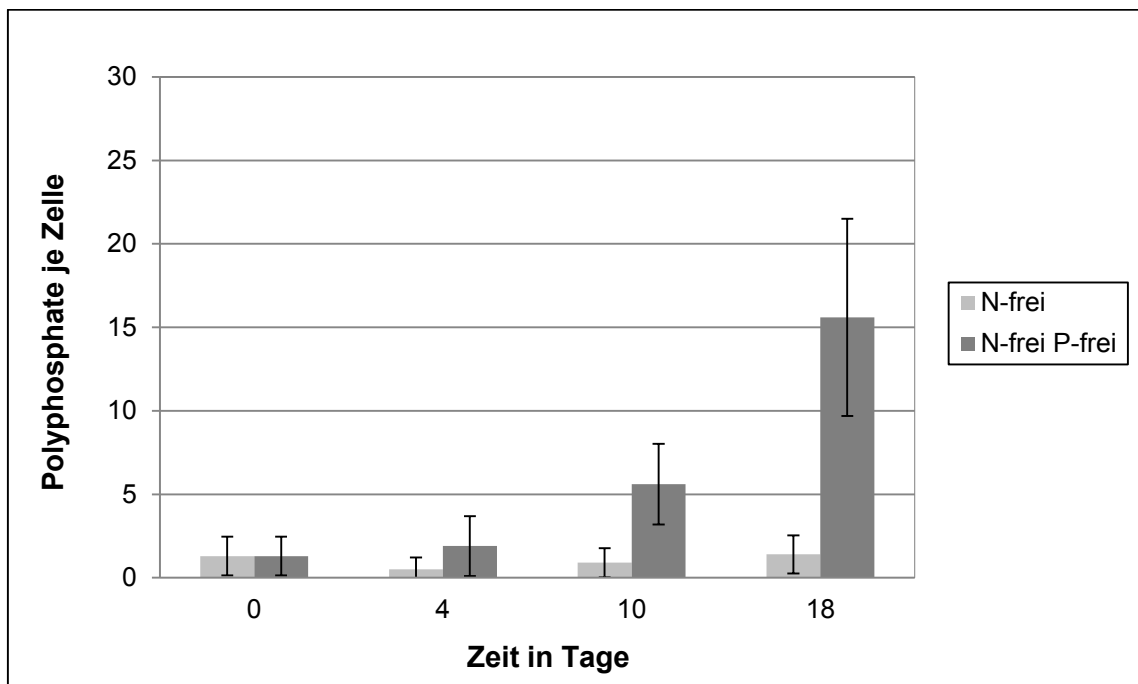
In den TEM-Aufnahmen von Filamenten der P-versorgten Ausgangskultur (Abbildung 34, Bilder 1 und 2) sind keine polyP-Granula vorzufinden. Indes konnte bei P-freier Kultivierung schon nach 4 Tagen eine erhöhte Akkumulation solcher Strukturen beobachtet werden. Gut erkennbar ist das vermehrte Auftreten von polyP (schwarze Punkte) in den Bildern 4 und 6 im Vergleich zu den Bildern 3 und 5 von Zellen aus der P-haltigen Anzucht (Abbildung 34).

Prägnanter ist der Unterschied hinsichtlich der polyP-Akkumulation nach 10 Tagen der Anzucht im P-haltigen Medium bzw. im P-freien Medium. Ohne Phosphat sind nun viele polyP-Granula je Zelle akkumuliert (Abbildung 35, Bilder 1 und 2). Nach 18 Tagen (Abbildung 35) ist der Unterschied in der Anzahl der polyP-Körperchen je Zelle unverkennbar. Es ist eine drastische Akkumulation in den *Nodularia* CCY9414-Zellen aus Phosphat-freier Kultivierung vorhanden (Bilder 4 und 6).

Dieser visuelle Eindruck wird durch die quantitative Zählung der polyP-Granula (Abbildung 36 und 37) bestätigt. Sowohl bei Nitrat-haltiger als auch -freier Kultivierung ohne Phosphatzusatz kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Polyphosphate je Zelle. Jeweils nach 10 Tagen war ein klarer Anstieg zu erkennen, der nach 18 Tagen sehr deutlich wurde. Die Anzahl der polyP-Granula betrug nach 18 Tagen im Schnitt bei Nitrat-versorgten Zellen 20 bzw. diazotroph gewachsenen Zellen nur 15 Stück. Dagegen wurden unter P-haltigen Bedingungen nur vereinzelt polyP detektiert.



**Abbildung 36: Quantitative Auswertung der polyP-Vorkommen bei Nitrat-haltiger Kultivierung.** Dargestellt ist die Anzahl der polyP-Granula je Zelle (n = 10).

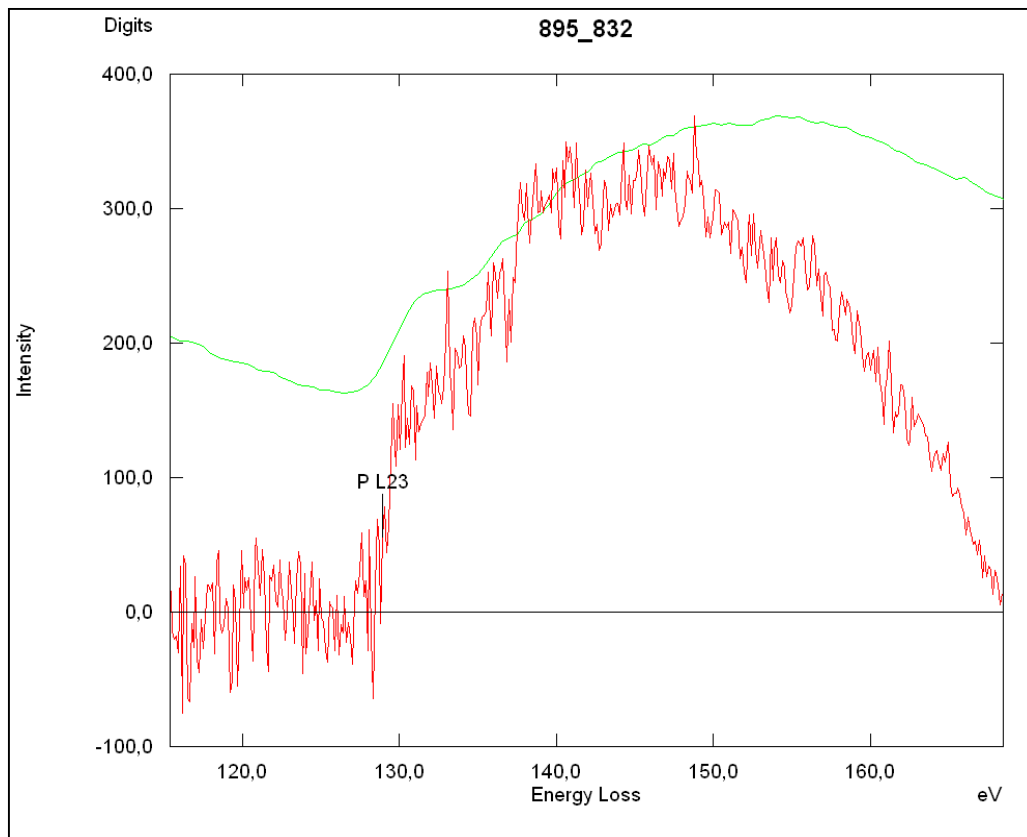


**Abbildung 37: Quantitative Auswertung der polyP-Vorkommen bei Nitrat-freier Kultivierung.** Dargestellt ist die Anzahl der polyP-Granula je Zelle (n = 10).

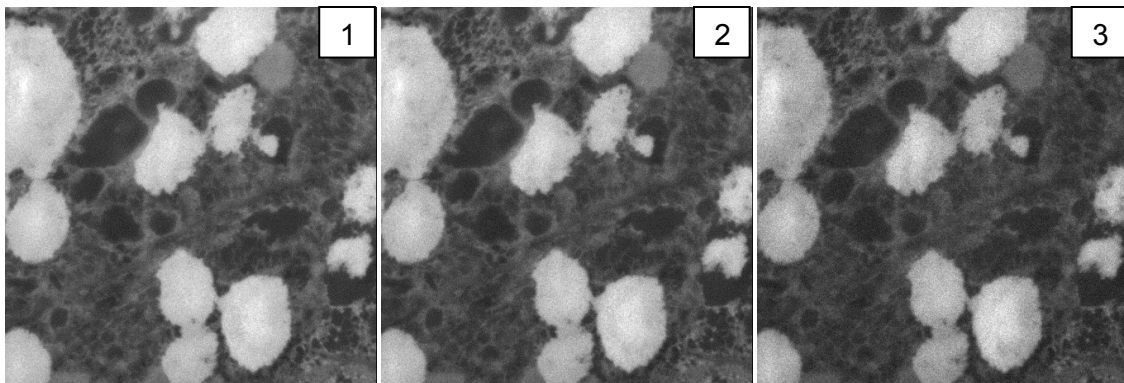
### 3.5.4 Verifizierung der polyP-Granula durch EELS bzw. ESI

Zur Überprüfung, ob die vermehrte Ansammlung der schwarzen Punkte in den TEM-Bildern (Abbildung 34 Abbildung 35) auch eindeutig polyP repräsentiert, wurde eine Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS) sowie ein spezifisches Elementemapping (ESI) durchgeführt. Bei dieser Methode wird der Energiefilter genau auf die Ionisationskante des Bereiches gesetzt, in der die Wechselwirkung des untersuchten Elementes mit Elektronen stattfindet. Hat man den Energiefilter dementsprechend positioniert, tragen nur solche Elektronen zum Bild bei, welche aus den Kernen des jeweiligen Elementes stammen. Somit erhält man eine elementsensitive Abbildung (Abbildung 38).

Die EELS-Untersuchungen zeigten eine spezifische Abschwächung des Elektronenschweifes in der Region, in welcher Phosphat den Elektronenstrahl inelastisch streut. Um den Hintergrund (nicht-P-spezifische Streuungen) vom Bild abziehen, wurde die 3-Fenster-Methode verwendet (Abbildung 39). Hierzu werden zwei Bilder im Bereich kurz vor der P-Ionen-Kante aufgenommen, um den exponentiellen Abfall des Hintergrunds vom Kantensignal abziehen. Zur eindeutigen Detektion von Phosphor werden mit Hilfe von Falschfarbe die helleren Stellen (Phosphat-reich) markiert und der Hintergrund subtrahiert (Abbildung 40).

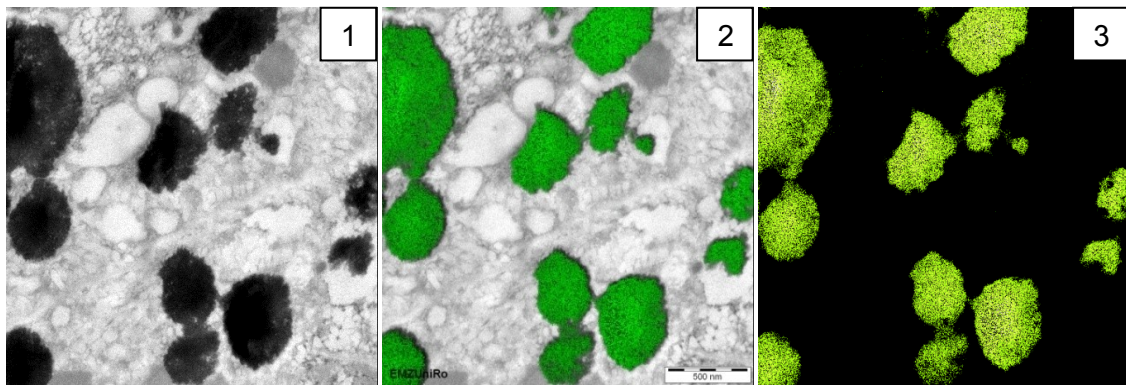


**Abbildung 38: EELS-Spektrum** der Phosphat-Kante, welches mit dem Elektronendetektor EM902 aufgenommen wurde. Das rote Spektrum stellt den Energieverlust für die Probe 895 (*Nodularia* CCY9414 nach 18 Tagen Nitrat-frei und P-frei) dar. Das grüne Spektrum ist eine standardisierte Kurve für Phosphat, dessen Absorptionskante bei 132 eV liegt.



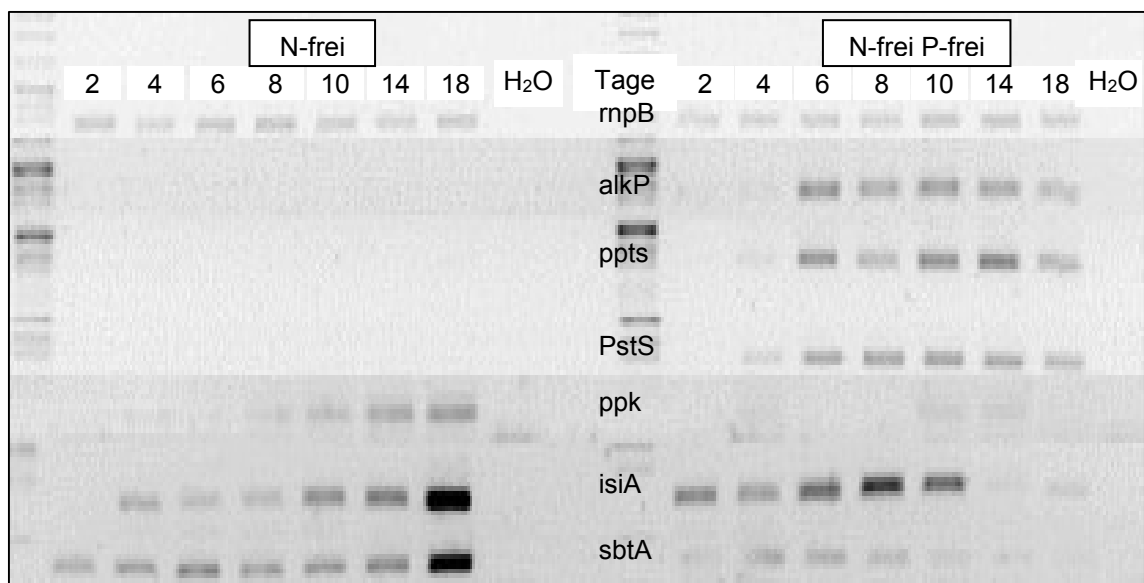
**Abbildung 39: ESI 3-Fenster-Methode zur Modellierung des Hintergrundes.** Bild 1 und 2: Aufnahmen mit 110 bzw. 121 eV vor der Phosphat-Kante, Bild 3: Aufnahme mit 153 eV auf dem Phosphatelementpeak.





**Abbildung 40: Phosphatnachweis in TEM Bildern von *Nodularia* CCY9414 mittels ESI.** Bild 1: Kombination aus morphologischem Bild und den 3 Kanten-Bildern. Bild 2: Grüne Bereiche zeigen Strukturen, die Phosphat-spezifisch Elektronen ablenken. Bild 3: Grün dargestellt ist die Phosphatverteilung nach Subtraktion des Hintergrundes.

### 3.5.5 Expressionsanalysen in Phosphat-limitierten Zellen



**Abbildung 41: Expressionsmuster verschiedener Gene in Zellen von *Nodularia* CCY9414 nach Phosphatmangel an verschiedenen Tagen. Links: Kontrollzellen mit Phosphat, Rechts: P-freie Kultivierung.** *mpB* – Ribonuklease P, *alkP* – alkalische Phosphatase, *ppts* – Phosphate/Phosphonat-ABC-Transportsystem, *PstS* – periplasmatisches Phosphatbindepotein, *ppk* – Polyphosphatkinase, *isiA* – Chl *a*-Bindepotein, *sbtA* – Natrium-Bicarbonat-Transporter.

Neben der Ultrastruktur wurde die Expression Phosphat-abhängiger Gene nach Phosphat-haltiger sowie Phosphat-freier Kultivierung untersucht (Abbildung 41). Der Abgleich der cDNA erfolgte auch hier mit *mpB*. Deutlich ist zu erkennen, dass Gene, welche der Anreicherung von Phosphat dienen, ausschließlich bei der P-freien Anzucht exprimiert werden. Das ist in der Detektion von c-DNA für die Gene *alkP* (EAW47381), *ppts* (EAW47337) und *PstS* (EAW43239) ersichtlich.



Dagegen wird das Gen *ppk* (EAW45226), welches ein Enzym zum polyP-Aufbau kodiert, verstärkt über die Dauer der Kultivierung im P-haltigem Medium exprimiert. Auffällig ist auch die zunehmende Expression der Gene *isiA* (EAW46340) und *sbtA* (EAW46250) bei der P-haltigen Kultivierung. Beide stellen sogenannte Indikatoren für Eisen- (*isiA*) und Kohlenstofflimitierung (*sbtA*) dar. Diese zeigen eine verminderte Expression unter P-freien Bedingungen ab Tag 10.

## 4 Diskussion

### 4.1 *In silico*-Analysen

Unter Benutzung des Blast-Algorithmus und Datenbanken wie NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oder Cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) ermöglichten *in silico* Analysen den Nachweis von Homologen zu bekannten Genen aus Modellorganismen wie *Synechocystis* sp. 6803 oder *Anabaena* sp. 7120 im Genom von *Nodularia* CCY9414. So wurden z.B. die Gene für photorespiratorische Proteine in *Nodularia* CCY9414 annotiert. Durch Forschungsarbeiten an *Arabidopsis thaliana* und später *Synechocystis* sp. PCC 6803 konnten alle Proteine ermittelt werden, welche am photorespiratorischen 2PG-Zyklus in Organismen mit oxygener Photosynthese beteiligt sind (Bauwe et al., 2010). Scanlan et al. wiesen 2009 selbst für die marinen *Synechococcus*- und *Prochlorococcus*-Stämme Proteine der Photorespiration nach. Diese Stämme sind durch ein stark reduziertes Genom charakterisiert. Für *Nodularia* CCY9414 konnten in den Blastp-Analysen (Tabelle 1) alle Proteine der Photorespiration detektiert werden. Dies bestätigt alle Untersuchungen bisher sequenzierter Cyanobakterien (Mulikdjanian et al., 2006; Kern et al., 2011).

Allerdings wurde erwartet, das *Nodularia* CCY9414 neben den Genen für Glycolat-Dehydrogenasen (EAW43978) auch ein Gen für eine Glycolat/Lactat-Oxidase aufweist, wie es beispielsweise für das diazotrophe Cyanobakterium *Anabaena* sp. 7120 beschrieben wurde (Hackenberg et al., 2011). Trotz der phylogenetischen Verwandtschaft zu *Anabaena* sp. PCC 7120 (beide sind in der Untersektion Nostocales, siehe Abbildung 4) konnte im *Nodularia* CCY9414 Genom kein homologes Gen zur Lactat/Glykolatoxidase (*all0170*) nachgewiesen werden. In der Photorespiration wird die Oxidation von Glykolat zu Glyoxylat bei *Nodularia* CCY9414 ähnlich zu *Synechocystis* 6803 (*slr0404*) durch eine Glycolat Dehydrogenase (EAW43978) katalysiert. Allerdings spielt die putative LOX/GOX als sauerstoffumsetzendes Enzym eine wichtige Rolle beim Schutz der Nitrogenase in stickstofffixierenden Cyanobakterien (Hackenberg et al., 2011). Zurzeit ist *Nodularia* CCY9414 der einzige Vertreter unter den stickstofffixierenden Cyanobakterien, der kein GOX-homologes Enzym im Genom aufweist. Eventuell befindet sich dieses Gen auf dem noch nicht sequenzierten Teil des *Nodularia* CCY9414 Genoms. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden auf DNA Ebene über PCR bzw. auf Proteinebene über Western-Blot Versuche zum LOX/GOX Nachweis durchgeführt, die erfolglos

blieben. Neben dem vermutlichen Fehlen der LOX/GOX ist es auch bemerkenswert, dass *Nostoc*-Stämme im Gegensatz zu den meisten anderen Nostocales Heterocysten auch in Gegenwart von Nitrat ausbilden bzw. behalten (Voß et al., 2013). Das deutet auf weitere Unterschiede im Mechanismus bzw. bei der Regulation der Stickstofffixierung hin.

Auch der in *Synechocystis* sp. 6803 beschriebene bakterielle Glyceratweg (Eisenhut et al. 2006), in dem Glyoxylat über Tatronsäure-Semialdehyd zu Glycerat umgesetzt wird, konnte in *Nodularia* CCY9414 nicht annotiert werden. Auch hier ist es natürlich möglich, dass die fehlenden Gene im derzeit unbekannten Teil des *Nodularia* CCY9414 Genoms zu finden sind.

Weitere Blastp-Analysen nach charakteristischen Stressproteinen sind in der Tabelle 2 dargestellt. Es konnten Gene ermittelt werden, die sogenannte Indikatorproteine für die unterschiedlichen Stress-Bedingungen kodieren. Dabei gelang im Laufe der durchgeführten Datenbankuntersuchungen die Annotierung des Gens für das Lichtstress-spezifische OCP (Orange-Carotin-Protein), das zuvor falsch zugeordnet war. Neben den Blastp-Analysen war auch die von mir beobachtete starke Induktion dieses Gens nach Lichtstress ein sicheres Indiz für OCP. Somit konnte ein wichtiger Beitrag zur weiteren Vervollständigung des Genoms mit dieser Arbeit geleistet werden.

## 4.2 Salzstress

Die Ergebnisse dieser Arbeit erklären die Anpassungsstrategien des Stammes *Nodularia* CCY9414 an das Brackwasserhabitat Ostsee. So konnte gezeigt werden, dass der Stamm im NaCl-freien Medium nicht wächst und eine Verringerung des Wachstums ab einer Salinität von 20 g NaCl l<sup>-1</sup> eintritt. Optimales Wachstum wurde bei 12,5 g NaCl l<sup>-1</sup> beobachtet, einer typischen Brackwassersalinität. Die Resultate decken sich mit bereits gewonnenen Erkenntnissen verwandter Nostocales-Stämme (Reddy et al., 1989; Fernandes et al., 1993; Moisaner et al., 2002). Diese Süßwasserstämme besaßen jedoch ihr Wachstumsoptimum unter salzfreien Bedingungen. Dies reflektiert die optimale Anpassung des Stammes *Nodularia* CCY9414 an die Ostsee und wird von Freilandergebnissen (Abbildung I; siehe Anhang) bestätigt, welche das größte Biomassevorkommen von *N. spumigena* bei Salinitäten von 7 PSU detektieren.

Die Salztoleranz von 2,5 - 25 PSU korreliert optimal mit der Akkumulation von Saccharose als alleiniges „compatible solute“ (Abbildung 11 bis 13). Die größte Saccharosekonzentration wurde in dem Bereich zwischen 7,5 und 20 PSU gemessen. Somit fungiert Saccharose als wichtige organische Verbindung zur Verringerung des

zellulären Wasserpotentials (Kempf und Bremer, 1998), ohne zelluläre Funktionen wie DNA-Replikation, DNA-Proteininteraktion und Stoffwechselaktivitäten zu beeinträchtigen (Record et al., 1998). Dieses Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen anderer Nostocales-Stämme (z.B. *Anabaena* sp. PCC 7119, Porchia und Salerno, 1996), welche auf Süßwasser- und Brackwasserhabitats beschränkt sind (Hagemann, 2011). Obwohl das Genom von *Nodularia* CCY9414 auch Gene für die Trehalosesynthese (ORF nsp39450, Voß et al., 2013) aufweist, konnten in keiner der Messungen solche detektiert werden. Untersuchungen am verwandten Stamm *Anabaena* sp. 7120 ergaben, dass auch dieser Genbereich für beide Osmolyte aufweist, Trehalose jedoch ausschließlich bei Trockenstress akkumuliert wurde (Higo et al., 2006). Wie es für „compatible solutes“ üblich ist, stieg auch die Konzentration von Saccharose mit wachsender Salinität. Die geringeren Akkumulationen bei sehr hohen Salzgehalten (ab 25 g NaCl l<sup>-1</sup>) sind durch toxische Effekte als auch durch Zellyse zu erklären.

Das Gelbild der RT-PCR-Analyse impliziert eine mögliche Regulation der Expression der Saccharose-Phosphat-Synthase (*spsA*) in Abhängigkeit zur Salinität und einer damit verbundenen verstärkten Akkumulation von Saccharose (Abbildung 16). Dass Saccharose als Hauptosmolyt in allen *Nodularia*-Stämmen fungiert, bewiesen Untersuchungen von Freilandproben (Abbildung 17). Hier wurden die höchsten Saccharosekonzentrationen in einer Probe an der Wasseroberfläche gemessen, die von *Nodularia*-Arten dominiert war (siehe 16s-Referenzbäume im Anhang).

Das *spsA* Gen von *Nodularia* CCY9414 zeigt einen Anstieg der mRNA-Gehalte proportional zum Salzstress bei unveränderter Expression des konstitutiven Haushaltsgens *mnpB*. Die salzinduzierte Expression und eine daraus resultierende Saccharoseakkumulation wurden auch bei Untersuchungen in *Anabaena* sp. PCC 7119 gezeigt (Porchia und Salerno, 1996). Eine mögliche direkte Stimulierung der Saccharosesyntheseenzyme durch erhöhte interne Salinitäten würde sich mit Untersuchungen in *Synechocystis* sp. 6803 decken (Hagemann und Marin, 1999; Novak et al., 2011). Marin et al. (2004) zeigten darüber hinaus eine Erhöhung der Expression vieler universeller Stressgene, z.B. *sodB*, nach Salzstress. Die Fe-haltige Superoxiddismutase (*sodB*) ist ein Indikatorgen für generelle Stressbedingungen und wird bei Starklicht, oxidativen Bedingungen und vielen anderen Stressen induziert (Los et al., 2008). Bei den Expressionsuntersuchungen von *Nodularia* CCY9414 sind keine Erhöhungen der mRNA-Gehalte unter den salinen Stressbedingungen erkennbar gewesen (Abbildung 14), dagegen wurde dieses Gen deutlich durch Starklicht und O<sub>2</sub> induziert (Abbildung 27). Somit ist zu vermuten, dass die Salzkonzentrationen

zwischen 5-20 PSU keine allgemeine Stresssituation für den Stamm *Nodularia* CCY9414 darstellen, wodurch dessen spezielle Anpassung an das Brackwasser der Ostsee unterstrichen wird.

Unter den Kulturbedingungen konnten zusätzlich hohe Konzentrationen an Glutamat und Kalium gemessen werden (Abbildung 12 und 13). Untersuchungen am Gram-negativen Enterobakterium wie z.B. *E. coli* zeigten unter salinen Stressbedingungen eine Kopplung der K<sup>+</sup>-Aufnahme mit der Glutamatsynthese. Glutamat erfüllt hier die Funktion des Gegenions zum Ausgleich der Ladungsverhältnisse (Cayley et al., 1992; McLaggan et al., 1994; Yan et al., 1996). Nach einer längeren Akklimatisierung wurden diese geladenen Verbindungen jedoch durch das Osmolyt Trehalose ersetzt (Dinnbier et al., 1988). In der vorliegenden Arbeit wurden signifikante Mengen dieser ionischen Substanzen nur bei sehr hohen (27,5 g NaCl l<sup>-1</sup>) und zum Teil auch bei sehr niedrigen (5 g NaCl l<sup>-1</sup>) Salzkonzentrationen gemessen. Unter Brackwasserbedingungen (hier 12,5 g NaCl l<sup>-1</sup>), bei denen ein optimales Wachstum für *Nodularia* CCY9414 zu beobachten war, wurden nur sehr geringe Mengen an Kalium und Glutamat gemessen. Somit scheinen diese Substanzen nur bei wirklichen Salzstressbedingungen zu wirken, unter denen nur ein schwaches Wachstum stattfindet und es somit mangels Photosynthese zu keiner ausreichenden Saccharosesynthese kommen kann. Hohe Kaliumkonzentration wurden bei Untersuchungen zur Salzanpassung auch bei verwandten Nostoc-Stämmen dokumentiert (Apte und Alahari, 1994). Untersuchungen an nicht stickstofffixierenden ozeanischen Cyanobakterien zeigten, dass Glutamat als Gegenion für Kalium unter N-Mangelbedingungen durch Glucosylglycerat ersetzt wird (Klähn et al., 2010). *Nodularia* CCY9414 als diazotrophes Cyanobakterium ist weitgehend unabhängig von externen N-Verbindungen und weist unter N<sub>2</sub>-fixierenden Bedingungen sogar erhöhte Glutamatkonzentrationen auf (Abbildung 12). Zusätzlich fehlen im Genom auch die Gene für die Biosynthese von Glucosylglycerat, wie es auch bei anderen marinen N<sub>2</sub>-Fixierern nachgewiesen wurde (Klähn et al., 2010).

#### 4.3 Starklicht

Bisher gab es für *Nodularia spumigena* keine molekularen Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von Starklicht. Arbeiten von Roleda et al. (2008) und Mohlin und Wulff (2009) beschränkten sich auf physiologische Untersuchungen. Hier wurden erstmalig die globalen Umsteuerungen des Genexpressionsmusters nach Licht- bzw. O<sub>2</sub>-Stress durch RNAseq untersucht. Die globale Auswertung der RNAseq-Analysen zeigte

(siehe Tabelle 6 und 7), dass es in der Expression bei ca. 100 TSS zu einer mindestens 3fachen Veränderung kam. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen bestätigten, dass die angewandten Versuchs- und Stressbedingungen gut gewählt waren, da sehr viele Gene, die bereits als Lichtstress-reguliert in Modellcyanobakterien charakterisiert waren, auch bei *Nodularia* CCY9414 aktiviert wurden. Unter den Top 25 der nach 3 Stunden Starklichtstress induzierten Gene (Tabelle 8) befanden sich ausschließlich Indikatorgene für die Anpassung an solche Extrembedingungen.

Die Rolle des D1 Proteins im Photosystem II sowie als primäres Ziel bei der Photoinhibition wurde ausführlich beschrieben (z.B. Niyogi, 1999). Zur Überwindung der Photoinhibition muss die Neusynthese den Abbau des geschädigten D1-Proteins übersteigen (Aro et al., 1993; Long und Humphries, 1994; Takahashi et al., 2007). Somit ist die bis zu 14fache Erhöhung der Transkriptionsmenge eines Gens für D1 (PsbA) ein Hinweis auf eine vermehrte Syntheserate des geschädigten D1-Proteins unter den Versuchsbedingungen. Proteine der CAB/ELIP/HLIP Superfamilie sind Teil des Photosystems II und spielen ebenfalls eine wichtige Rolle beim Lichtschutz (Kilian et al., 2007). CABs sind Bindeproteine für Chl *a* und Carotinoide (Jansson, 1999). Diese Proteine werden schnell nach Lichtstress induziert (ELIPs; early light induced protein) und schützen den Photosyntheseapparat vor der oxidativen Schädigung während der Thylakoidmembranentwicklung (Adamska, 1997) sowie der Chlorophyllbiosynthese (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007). *Synechocystis*-6803-Mutanten ohne HLIPs (high-light-inducible proteins) waren unter Starklichtbedingungen nicht lebensfähig, was deren Rolle bei der Starklichtanpassung unterstreicht (Funk und Vermaas, 1999; He et al., 2001).

Weiterhin wurden Gene für Proteine gefunden, die an diversen Photosynthese-assoziierten Prozessen mitwirken. UbiB ist eine Oxygenase, die bei der Biosynthese von Plastochinon beteiligt ist. Diese Verbindung ist für den Elektronentransport zwischen den Photosystemen von essentieller Bedeutung (Mulkidjanian et al., 2005). An der Synthese von Carotinoiden beteiligt ist die Beta-Carotin-Ketolase. Carotinoide dienen dem Schutz vor Schäden durch UV-Strahlung, Starklicht und Sauerstoffradikale (Britton et al., 1995). Cyanobakterien benutzten Phycobilisomen als Antennensysteme, um insbesondere bei Lichtmangel auch grünes und gelbes Licht zu absorbieren und die Energie auf die Photosysteme zu übertragen (Grossmann et al., 1993). Dass es bei dem durchgeführten Starklichtexperiment zur Stresssituation durch Absorption von zu viel Licht kam, kann anhand der erhöhten Expression des NblA-Proteins nach 3 Stunden Starklichtstress abgeleitet werden (Abbildung 23). NblA ist am Abbau der Phycobilisomen beteiligt, indem es diese bindet und eine Proteolyse in Gang setzt,

wodurch dieser Antennenkomplex inaktiviert bzw. vermindert wird (Karradt et al., 2008). Für den Modellorganismus *Synechocystis* 6803 sind zwei *nblA*-Gene (*ssl0452* und *ssl0453*) beschrieben, deren Genprodukte am Phycobilisomenabbau mitwirken (Collier und Grossman, 1994).

Die Hauptmenge der im Lichtprozess erzeugten Produkte wird bei der CO<sub>2</sub>-Fixierung verbraucht, sodass eine gute CO<sub>2</sub>-Versorgung einen Lichtschutzmechanismus darstellt. Cyanobakterielle Kohlenstoffkonzentrierungsmechanismen (CCM) dienen dazu, die intrazellulären Konzentrationen von CO<sub>2</sub> nahe der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase) zu erhöhen. Bedingt dadurch wird in Cyanobakterien die schlechte kinetische Effizienz dieses Enzyms ausgeglichen (Kaplan et al., 1980; Kaplan und Reinhold, 1999; Price et al., 2002). Folglich verwundert es nicht, dass im durchgeführten Starklichtexperiment auch Gene für CCM-Komponenten im Expressionsniveau beeinflusst wurden. Bei einem ähnlichen Experiment mit *Synechocystis* 6803 konnten Hihara et al. (2001) in Microarray-Untersuchungen eine Erhöhung des mRNA-Gehaltes für die homologen CcmK-Gene, *ssl1028* und *ssl1029* (CcmK1 und CcmK2) nach 15 Minuten Starklichteinfluss beobachten. Dies steht im klaren Widerspruch zu meinen Resultaten der RNAseq-Analysen, da hier nur wenige reads detektiert wurden und diese leicht abnahmen (Daten hier nicht verwendet). Diese durch Starklicht ausgelöste Expression von CCM-Genen konnte ebenso nicht in der Arbeit von McGinn et al. (2003) bestätigt werden. Beim Gen für das CcmM-Protein (*ssl1031*) konnte ebenfalls keine Expressionsveränderung unter erhöhtem Lichteinfluss, wie bei McGinn und widersprüchlich zu Hihara, beobachtet werden. Allerdings kam es zu einer starken Expressionsabnahme im Verhältnis zur Kontrolle um 0,6 nach 30 Minuten Starklicht- und Sauerstoffstress. Bei McGinn et al. (2003) kam es bei dem Gen für das CcmK3-Protein unter CO<sub>2</sub>-Mangel zu einer Erhöhung der Expression. Die starke Verminderung der reads des CcmK3-Gens (*slr1838*), in *Nodularia* CCY9414 nach 3 Stunden Lichtstress lässt sich daher folgendermaßen interpretieren: Bei den Experimenten mit *Synechocystis* 6803 erfolgte eine stetige Begasung mit CO<sub>2</sub>, welche hier nicht stattfand. Daher wird die Starklichtbehandlung zu einem schnellen CO<sub>2</sub>-Mangel und einem möglichen O<sub>2</sub>-Überschuss führen. Damit stellt sich nach 3 Stunden Starklicht eine massive Stresssituation ein. Die Resultate dieser Arbeit verbunden mit bisherigen Ergebnissen (z.B. Hihara et al., 2001 und McGinn et al., 2003) lassen in Bezug auf die Vielfalt der verschiedenen Proteine für eine CO<sub>2</sub>-Konzentrierung vermuten, dass diese für verschiedenste Bedingungen sensitiv sind. Unter Extrembedingungen werden nicht benötigte Gene bedingt durch einen Mangel, in diesem Fall löslicher Kohlenstoff, in

ihrer Expression herunter reguliert. Ein ähnlicher Effekt war auch beim Gen für das CP12-Protein zu beobachten. Tamoi et al. (2005) beschrieben die regulatorische Funktion dieses Proteins für die Aktivität des Calvin Zyklus in Cyanobakterien. Die Expressionsverminderung von CP12 könnte evtl. darauf hinweisen, dass die Aktivität des Calvin-Zyklus unter Starklichtbedingungen und CO<sub>2</sub>-Mangel vermindert wird.

In Abbildung 21 sind Gene in ihrem Expressionsverhalten dargestellt, welche ausschließlich bei zusätzlichem Sauerstoffeinfluss ihr Expressionsverhalten ändern. Ein Protein soll die Auskeimung von Akineten beeinflussen. Akineten sind cyanobakterielle Dauerzellen (ähnlich Sporen), die sich sowohl bei Phosphor- und Lichtlimitierung als auch bei erhöhten Sauerstoffkonzentrationen aus vegetativen Zellen differenzieren (van Dok und Hart, 1997). Für *Nodularia*-Stämme wurde eine Induktion der Akinetenbildung durch die Faktoren Licht und Temperatur gezeigt (Huber, 1984). Somit konnten in dieser Arbeit erstmals Hinweise für eine mögliche Induktion der Akinetenbildung unter erhöhten Sauerstoffkonzentrationen erbracht werden. Weiterhin konnte für das nicht-charakterisierte aber hochkonservierte „hypothetical protein“ (EAW44742), welches in fast allen Cyanobakteriengenomen zu finden ist, eine O<sub>2</sub>-Abhängigkeit der Expression nachgewiesen werden.

Die Expression der Indikatorgene *ocp* und *sodB* nahm in *Nodularia* CCY9414 nach Licht- bzw. O<sub>2</sub>-Stress zu (Abbildung 17 und 27). Dies untermauert auch für *Nodularia* CCY9414 die Wichtigkeit dieser Proteine als Schutzmechanismus vor einer Photoinhibition. Die überschüssige Anregungsenergie von Phycobilisomen unter Starklicht wird auf *ocp* übertragen, welches diese als Wärme abgibt (cyanobakterielles NPQ) (Kirilovsky, 2007). Mutanten mit einem OCP-Defekt reagieren sensitiv gegenüber Starklicht-Stress (Wilson et al., 2006). Eine gesteigerte Expression der Superoxid-Dismutase (*sodB*) wurde für viele Stressbedingungen in *Synechocystis* 6803 wie z.B. Licht (Kim und Suh, 2004), Salz (Marin et al., 2004), oxidativer Stress (Bhattacharya et al., 2004), gezeigt. Somit muss es durch den Starklichtstress zur Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) in *Nodularia* CCY9414-Zellen gekommen sein, welche durch *sodB* und Peroxidasen zu H<sub>2</sub>O abgebaut werden.

Gene für die Synthese des Mycosporins Shinorin zeigten in den RNAseq-Analysen ebenfalls eine erhöhte Expression unter Starklicht sowie nach 30 Minuten kombinierten Starklicht- und O<sub>2</sub>-Stress. Mit Hilfe von Fluoreszenzuntersuchungen bewiesen Mohlin und Wulff (2008) ein erhöhtes Aufkommen dieser Verbindungen unter Starklicht. Im Vergleich zum Normallicht wurde eine 60–130 % höhere Absorption im Mycosporin-Absorptionsbereich nachgewiesen (Wulff et al., 2007). In Transkriptom-Analysen wurden die Genhomologe analysiert (Voß et al., 2013).



Erstmals konnten in der vorgelegten Arbeit das Gencluster sowie der gemeinsame Transkriptionsstartpunkt charakterisiert werden (Abbildung 25). Dies diente als Hinweis für die Bedeutung von MAAs für die Starklichtanpassung von *Nodularia* CCY9414. Mutationsexperimente am artverwandten Stamm *Anabaena variabilis* PCC 7937 blieben erfolglos und zeigen somit die essentielle Bedeutung dieser Proteine (Singh et al., 2012). Als Vorstufe zur Shinorinsynthese dient Glycin (Gao und Garcia-Pichel, 2011). Mit diesem Hintergrund ist die Interpretation der Aminosäure-Analysen (Tabelle 5) aus zwei Blickwinkeln möglich: Zum einen lässt das hohe Glycin/Serin Verhältnis auf starke Aktivitäten des photorespiratorischen Zyklus schließen. Doch weder in den RT- noch in den RNAseq-Analysen konnten stark erhöhte Expressionsmuster für Gene photorespiratorischer Enzyme bei Starklichtstress detektiert werden (Abbildung 18 und 28). Die Photorespiration als essentieller Mechanismus (Eisenhut et al., 2008) und deren Bedeutung zum Schutz vor einer Photoinhibition (Hackenberg et al., 2009) bei Cyanobakterien ist jedoch bestätigt. Daneben ist Glycin an der Shinorin-Biosynthese beteiligt, sodass die beobachteten Mengen eventuell mit dessen Synthese korrelieren. In anderen Experimenten (Salzstress und Phosphatmangel) wurden keine Unterschiede im Glycin/Serin-Verhältnis beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Das L-Protein als Teil des GDC weist unter erhöhtem O<sub>2</sub>-Einfluss jedoch eine verstärkte Expression auf. Dies wiederum lässt eine Beeinflussung der Photorespiration durch hohe Sauerstoffkonzentrationen vermuten.

Charakteristische Expressionsänderungen wurden für die Gene *isiA* und *fadA* nachgewiesen. Beides sind Indikatorgene für eine Eisenlimitierung. Eisen ist eine der zentralen Komponenten vieler Enzyme und von besonderer Bedeutung bei den Redoxreaktionen der respiratorischen und der photosynthetischen Elektronentransportkette (Nield et al., 2003). Reaktionen auf Eisenstress und oxidativen Stress überlappen sich häufig, da in beiden Zellen Eisenzentren betroffen sind. Eine Eisenabnahme während der kurzen Dauer des Experiments ist eher unwahrscheinlich. Daher ist die Induktion von *isiA* und *fadA* eher eine ROS-Schutzreaktion wie auch die Akkumulation von OCP oder MAAs. Spezifisch auf einen Eisenmangel reagierende Gene kodieren z.B. für Eisentransporter. Diese wurden nicht unter den hier induzierten Genen gefunden, so dass ein Eisenmangel eher auszuschließen ist.

Cyanobakterien bilden bioaktive Substanzen, die als Toxine im Fraßschutz oder als allelopathische Mittel zur Verminderung des Wachstums von Mitbewerbern dienen

können (Leflaive und Ten-Hage, 2007). In der Ostsee ist *Nodularia spumigena* die einzige Planktonspezies, welche das Hepatotoxin Nodularin produziert (Sivonen und Jones, 1999). Untersuchungen ergaben, dass Nodularin schädliche Effekte auf verschiedene Krebstiere, wie Copepoden und Gammariden (Ojaveer et al., 2003; Korpinen et al., 2006), aber auch auf kleinere Fische (Pääkkönen et al., 2008) hat. Der Anstieg der Toxin-Konzentration in *Nodularia spumigena* wird durch das Vorhandensein von Fraßfeinden wie Mesozooplankton bewirkt (Gorokhova und Engstroöm-Öst, 2009). ROS besitzen neben ihrer Toxizität auch eine Signalfunktion in Stress-Situationen, wie z.B. Trockenheit, Starklicht oder Pathogen-Befall (Niyogi, 1999; Lesser, 2006; D'Autreaux & Toledano, 2007; Foyer et al., 2009; Latifi et al., 2009). Die verstärkte Expression von Enzymen für die Nodularinsynthese bei erhöhter Sauerstoffzufuhr und in den ersten 30 Minuten nach Starklicht (Abbildung 20 und 30) deutet auf eine Induktion der Toxin-Synthese durch ROS hin, welche auf Grund der erhöhten O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 40 % vermehrt entstehen. Eine durch ROS induzierte Produktion von Toxinen wurde erstmals von Vassilakaki und Pflugmacher (2008) diskutiert. Weiterhin können Toxine durch eine Bindung an verschiedene Proteine, beispielsweise die des Calvin-Zyklus oder an NADP-abhängige Reduktasen, regulatorische Funktionen ausüben (Zilliges et al., 2011). Auch bei diesen Untersuchungen an *Microcystis* sp. wurde eine verstärkte Expression von Microcystin-Syntheseenzymen unter Starklicht als auch bei einem Vorkommen von ROS-Verbindungen beobachtet. Auf Grund dieser Hintergründe und der erzielten Datenlage ist eine Aktivierung der Biosynthese von Nodularin unter Stressbedingungen und den damit entstehenden ROS-Verbindungen in *Nodularia* CCY9414 von Bedeutung.

Die in diesem Versuch erzielten Erkenntnisse spiegeln die Anpassung von *Nodularia* CCY9414 an die in der Ostsee vorherrschenden Bedingungen zur Spätsommerblüte wider. Es gibt keine Einzelstrategie, sondern es ist viel mehr das Zusammenspiel vieler Mechanismen, die eine Akkumulation von *Nodularia*-Filamenten an der Oberfläche, charakterisiert durch extreme Lichteinstrahlung und hohe O<sub>2</sub>-Konzentration, ermöglichen. Darunter fallen hohe Induktionsraten von sogenannten „Abwehrgenen“, welche Proteine kodieren, die z.B. schädliche Verbindungen abbauen oder umwandeln (ROS, MAAs, Superoxiddismutase, Photorespiration, Verringerung der Pigmente, Freisetzung von Toxinen).

#### 4.4 Phosphor

Im Sommer unter nährstoffarmen Bedingungen bilden *Aphanizomenon* sp. und *Nodularia spumigena* oft eine Koexistenz in den Blüten. Dabei ist *Aphanizomenon* eher am Anfang dominierend und *Nodularia* weist am Ende der Blüte einen höheren Biomasseanteil auf (Kononen, 1992; Wasmund, 1997; Laamanen und Kuosa, 2005). Diese Befunde deuten daraufhin, dass *Nodularia* besser mit niedrigen Konzentrationen an gelösten Phosphaten auskommt, was sich auch durch die höhere Affinität in der Phosphataufnahme begründet (Wallström et al., 1992; Degerholm et al., 2006). *Nodularia spumigena* wird eine hohe Affinität für gelöste organische P-Verbindungen (Wallström et al., 1992; Degerholm et al., 2006) nachgesagt. Daher kann es schlechter auf plötzliche Phosphateinflüsse zum Auffüllen endogener Reserven als *Aphanizomenon* sp. reagieren (Vahtera, 2005). Degerholm et al. (2006) ermittelten eine bis zu 9fach stärkere Affinität der alkalischen Phosphatase von *Nodularia spumigena* im Vergleich zu der von *Aphanizomenon* sp.. Im durchgeführten Experiment wurde die einzige P-Quelle ( $K_2HPO_4$ ) aus dem ASNIII-Medium entfernt, um die Bedingungen des Phosphatmangels wie im Spätsommer, wenn auch keine anorganischen Phosphate mehr vorhanden sind, zu simulieren (Laanemets et al., 2004; Nausch und Nausch, 2006). Wie erwartet, findet unter Phosphat-freien Bedingungen kein Wachstum mehr statt. Neben Licht und Temperatur stellt die Verfügbarkeit von Phosphorverbindungen eine der wichtigsten begrenzenden Faktoren für diazotrophe Cyanobakterien dar (Wulff et al., 2007). Die Analyse der Expressionsmuster von P-regulierten Genen (Abbildung 41) führt zu ähnlichen Ergebnissen wie bisherige Phosphatmangeluntersuchungen in *E. coli*, *Synechococcus* sp. und *Synechosystis* sp. 6803 (Scanlan et al., 1993; Scanlan et al., 2009; Pitt et al., 2010). In den genannten Fällen erfolgte genau wie bei *Nodularia* CCY9414 eine verstärkte Expression der Gene für die Aufnahme von anorganischen P-Verbindungen, *ppts* (Phosphate/Phosphonat-ABC-Transportsystem) und *pstS2* (periplasmatisches Phosphatbindeprotein). Diese Ergebnisse sind deckungsgleich mit Untersuchungen an Modellorganismen (z.B. Pitt et al., 2010). Bei *Synechocystis* sp. 6803 kam es unter P-Mangelbedingungen, zu einer 318fachen erhöhten Expression des *pstS2*- Gens schon nach 48 Stunden. Somit bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Bedeutung des *pstS2*-Phosphatbindeproteins unter Phosphatmangelbedingungen, da es sich durch eine sehr hohe Affinität und niedrige Reaktionsgeschwindigkeit auszeichnet (Pitt et al., 2010). Ebenfalls kam es nach 6 Tagen P-Mangel zur erhöhten Expression der alkalischen Phosphatase. Dies bestätigt Ergebnisse mit dem *Nodularia spumigena*

Isolat (AV1), in denen die Aktivitäten dieses Enzyms mittels Fluoreszenz-markierten Substraten ermittelt wurde (Vahtera et al., 2007).

Der Expressionsanstieg der Gene *isiA* und *sbtA* deutet eine Limitierung weiterer Nährstoffe an, wenn die Kultur mit Phosphat versorgt war. Die extreme Zunahme der *isiA*-Banden nach 18 Tagen P-haltiger Kultivierung ist ein Indikator für die einsetzende Eisenlimitierung im Medium. Die viel schwächere Expression in der P-freien Kultivierung, verbunden mit der Abnahme nach 10 Tagen, ist durch das nicht vorhandene Wachstum und Absterben der Filamente zu erklären.

Die zunehmende Expression der Polyphosphatkinase (*ppk*) in der P-haltigen Anzucht deutet auf eine erhöhte Bildung von polyP. Allerdings kam es nicht zu einer sichtbaren Anreicherung dieser Granula in den EM-Bildern. Somit muss es bei der Kultivierung mit Phosphat zu einem schnellen polyP-turnover kommen, wobei die polyP-Aufbaurate und der Abbau zu ATP miteinander korrespondieren.

Das verstärkte Auftreten von polyP-Granulaten unter Phosphat-freien Bedingungen (Abbildung 36 und Abbildung 37) scheint auf den ersten Blick sehr verwunderlich, da es trotz des Mangels an  $\text{PO}_4^{3-}$  zu einer rapiden Akkumulation des Phosphatspeichers im Laufe des Versuches kam. Die Überprüfungen mittels EELS und ESI ergaben jedoch eindeutig, dass es sich um polyP-Granula handelt. Dieses ungewöhnliche Verhalten von *Nodularia spumigena* lässt sich schwierig erklären. Die starke Expression von *pstS2* zeigte zunächst eindeutig, dass die Zellen tatsächlich einem P-Mangel ausgesetzt waren. Bei einem Mangel an  $\text{PO}_4^{3-}$  kommt es auch zu keiner verstärkten Expression von *ppk* und einer damit verbundenen polyP-Bildung. Trotzdem war eine verstärkte polyP-Granula-Bildung in Abwesenheit möglicher P-Quellen feststellen. Ähnliche Beobachtungen gab es auch bei der Freilandbeprobung einer von *Aphanizomenon* spp. dominierten Blüte (Abbildung II; siehe Anhang). Auch hier wurden mittels TEM zahlreiche polyP-Granula in den Zellen beobachtet, obwohl sich keine detektierbaren anorganischen Phosphatmengen im Oberflächenwasser befanden. Auf Grund des ausbleibenden Wachstums mit der Dauer meines Experiments möchte ich hier als mögliche Phosphat-Quellen den Abbau von Phospholipiden bzw. DNA, welche große Mengen an Phosphat enthalten, vorschlagen. Zusätzlich muss es zu einer verstärkten Zentrierung aller löslichen P-Verbindungen an den einzelnen Granula kommen, welches sich mit der verstärkten Expression der P-Transportergene deckt (*ppts*). *Nodularia* CCY9414 muss Mechanismen besitzen, welche einen Mangel an freien P-Verbindungen detektieren. Als eine Reaktion werden noch vorhandene P-Verbindungen nicht verbraucht sondern in Granula eingelagert bis eine mögliche Besserung eintritt. Denkbar wäre auch, dass diese Zellen Vorläufer für

eine Bildung von Akineten darstellen, die zur Überdauerung zwischen den jährlichen Blüten dienen. Akineteninduktionen wurden bereits nach Phosphorlimitierung beobachtet (Huber, 1985; van Dok und Hart, 2008). Für *Nodularia spumigena* konnten hier im Gegensatz zu anderen Cyanobakterien der Ostseebülte (Suikkanen et al., 2010) noch keine Erkenntnisse gewonnen werden. Akineten und Filamente von *Nodularia* sind selten im Winter in Sediment- und Wasserproben zu finden (z.B. Laamanen und Kuosa, 2005). Untersuchungen von *Nodularia*-Arten in australischen Flussmündungen deuten jedoch eine Akinetenbildung unter niedrigen P-Bedingungen an (Huber 1984, 1985).

Mit Hilfe meiner Erkenntnisse und zusätzlichen Literaturrecherchen lässt sich folgende These zur Entstehung von *Nodularia*-Blüten aufstellen:

Im Winter herrschen an der Oberfläche hohe Konzentrationen von anorganischem Stickstoff und Phosphat (DIN und DIP) 16:1 (Suikkanen et al., 2007). Die Stickstoffaufnahme der Frühlingsblüte führt zu einem schnellen Abbau des DIN:DIP Verhältnisses und einem daraus resultierenden Überschuss an DIP in der thermisch geschichteten pelagischen Oberflächenschicht (Laanemets et al., 2006). In der Periode nach der Frühlingsblüte kommt es zu einem Verbrauch des überschüssigen DIP (Larsson et al., 2001) verbunden mit einer Verminderung des biologisch verfügbaren, gelösten organischen Phosphors (Nausch und Nausch, 2006). Kommt es nun zum Anstieg von Licht und Temperatur bilden Cyanobakterien wie *Aphanizomenon* sp. die Blüte, da sie ein geringeres Temperaturwachstumsoptimum besitzen (Lehtimäke et al., 1997; Wasmund, 1997). Die schon in der Wassersäule vorhandenen *Nodularia*-Fäden nehmen das noch vorhandene freilösliche anorganische Phosphat auf. Zusätzlich wurde ein starker Stickstoffmangel in eutrophierten Regionen in der Ostsee beobachtet (Tamminen und Anderson, 2007). Diese Voraussetzung, verbunden mit zunehmendem Temperatur- und Lichtanstieg sowie ruhigen Windverhältnissen, führen zu einer Begünstigung fadenförmiger diazotropher Cyanobakterien, da diese den Stickstoffmangel durch Fixierungsmechanismen ausgleichen können.

Wenn Blüten von diazotrophen Spezies dominiert werden, liegen N<sub>2</sub>-freie Bedingungen vor. Später kommt es ebenfalls zur Limitierung von Phosphor und anderen Spurenelementen (Karl et al., 2001; Lignell et al., 2003). Organismen mit effizienten Aufnahme- oder guten Speichersystemen haben einen Vorteil unter diesen Mangelbedingungen. In den Experimenten dieser Arbeit zeigte *Nodularia* CCY9414 mit der starken Expression von P-Transportsystemen und einer hocheffizienten P-Speicherung unter P-Mangel gute Voraussetzungen, um erfolgreich um die verbliebenen P-Ressourcen zu konkurrieren.

Basierend auf zellulären Speichern und der Hydrolyse aus organischen Verbindungen kommt es zum Wachstum einer *Nodularia* dominierten Blüte (Degerholm et al., 2006; Nausch und Nausch, 2006; Vahtera et al., 2007). Die eigentliche Blüte beschränkt sich auf einen kurzen Entwicklungszeitraum, da in der Wassersäule kein P-Pool mehr vorhanden ist (Wasmund, 1997; Laamanen und Kuosa, 2005). Bei extremer Nährstofflimitation kombiniert mit oxidativem Stress werden schließlich Akineten differenziert, die im neuen Jahr eine neue Blüte hervorbringen können.

Das Auftreten von hohen Biomassen an Cyanobakterien im Spätsommer ist bedingt durch die Phosphatkonzentration der Oberflächenschicht im Winter (Jansen et al., 2004) sowie dem Verbrauch in der Frühjahrsblüte (Walve und Larsson, 2007) geregelt. Weitere wichtige Faktoren für ein Auftreten sind: die Anpassung an das saline Habitat, Temperatur, Licht, Sauerstoffstress und Wind.

## 5 Ausblick

Es gibt viele Studien von *Nodularia spumigena* hinsichtlich der Blütendynamik, deren Regulation (z.B. durch Nährstoffverhältnisse) und der Hepatotoxinproduktion im Freiland. Das sequenzierte Ostseeisolat *Nodularia* CCY9414 bietet nun die Möglichkeit, molekulare Experimente an einem definierten Untersuchungstamm im Labor vergleichend zum Freiland durchzuführen. Die in dieser Arbeit konzipierten und optimierten Untersuchungsprotokolle ermöglichen die Verwendung von *Nodularia* CCY9414 als zukünftigen Modellstamm für weitere gezielt molekularbiologische Fragestellungen hinsichtlich der Anpassungsstrategien für eine Blütenbildung.

Durch die Etablierung eines Mutationsprotokolls für *Nodularia* CCY9414 würde sich dessen Wert als Modellstamm deutlich erhöhen. Durch eine gezielte Mutagenese wäre es möglich, die Funktion ausgewählter Gene bzw. Genprodukte während der Blütenbildung besser zu analysieren. So könnte man z.B. die Bedeutung einzelner Mechanismen, wie den der Photorespiration genauer erörtern. Einen Ansatz könnte hier das etablierte Mutationsprotokoll (Elhai und Wolk, 1988) für den nah verwandten Stamm *Anabaena* sp. PCC 7120 darstellen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können ebenso als Voraussetzung für nun mögliche molekulare Freilanduntersuchungen dienen. Die hier verwendeten Untersuchungsprotokolle könnten einen Ausgangspunkt für die Etablierung einer Tool-Box zur molekularen Untersuchung von *Nodularia*-dominierten Blüten direkt in der Ostsee darstellen. Die dann gewonnenen Ergebnisse ermöglichen unter Hinzunahme der Laboruntersuchungen neue Interpretationsmöglichkeiten. Zum Beispiel könnten Genexpressionsmuster an RNA aus einer Blüte mit denen dieser Arbeit verglichen werden. Ähnliche Muster von Indikatorgenen würden vorhandene Stressbedingungen für die Freilandproben nachweisen, in dem man die natürliche Zelle und nicht die Wasserparameter als Sensor nutzt. Technische Probleme durch hohe Umsatzraten von RNA und eine mögliche Veränderung der Expression bei der Probenentnahme können durch sofortige Fixierung der Zellen in speziellen Wasserschöpfern verhindert werden (Feike et al., 2011). Somit könnte aus den Wasserproben gewonnene intakte RNA analog zu dieser Arbeit für Metatranskriptomanalysen verwendet werden. Durch diese Datensätze könnten Aussagen über die Dynamik der gesamten mikrobiellen Population sowie des Genexpressionsmusters von *Nodularia spumigena* im Verlauf der Blütenentwicklung getroffen werden. Parallel zu der metatranskriptionellen Analyse müsste natürlich eine umfassende Datenerhebung klassischer Parameter (Zellzahl,

Pigmentgehalte, Nährstoffkonzentrationen, Klima, Licht etc.) der Cyanobakterienblüte erfolgen. Eine solche integrierte Analyse sollte neue Erkenntnisse zum Phänomen der Blütenbildung ermöglichen.



## 6 Literaturverzeichnis

- Adamska I. 1997.  
ELIPs: light-induced stress proteins. *Plant Physiol* 100:794–805.
- Ahn K, Kornberg A. 1990.  
Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J Biol Chem* 265:11734-11739.
- Alexova R, Fujii M, Birch D, Cheng J, Waite TD, Ferrari BC, Neilan BA. 2011.  
Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environ Microbiol* 13:1064-1077.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002.  
Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53:1331-1341.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990.  
Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- Apte SK, Alahari A. 1994.  
Role of alkali cations (K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>) in cyanobacterial nitrogen fixation and adaptation to salinity and osmotic stress. *Indian J Biochem Biophys* 31:267-279.
- Aro EM, Virgin I, Andersson B. 1993.  
Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1143:113-134.
- Bailey S, Grossman A. 2008.  
Photoprotection in cyanobacteria: regulation of light harvesting. *Photochem Photobiol* 84:1410-1420.
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR. 2010.  
Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci* 15:330-336.
- Bazett-Jones DP, Ottensmeyer FP. 1981.  
Phosphorus distribution in the nucleosome. *Science* 211:169-170.
- Bergman B, Sandh G, Lin S, Larsson J, Carpenter EJ. 2012.  
*Trichodesmium* - a widespread marine cyanobacterium with unusual nitrogen fixation properties. *FEMS Microbiol Rev* 37:286-302.
- Berry JW, Chappell DG, Barnes RB. 1946.  
Improved method of flame photometry. *American Chemical Society* 18:19-24.
- Bhattacharya J, GhoshDastidar K, Chatterjee A, Majee M, Majumder AL. 2004.  
*Synechocystis* Fe superoxide dismutase gene confers oxidative stress tolerance to *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 316:540-544.

- Bhaya D, Dufresne A, Vault D, Grossman A. 2002.  
Analysis of the hli gene family in marine and freshwater cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 215:209-219.
- Bowes G, Ogren WL, Hageman RH. 1971.  
Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 45:716-722.
- Bremer E, Krämer R. 2000.  
Coping with the osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In *Bacterial stress response*.
- Hengge-Aronis, R. (Eds). 1995.  
Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 9:1551-1558.
- Castenholz RW, Garcia-Pichel F. 2000.  
Responses to UVR. In: *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space* (Whitton BA, Potts M, eds). . Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, Boston:591-611.
- Cayley S, Lewis BA, Record MT, Jr. 1992.  
Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 174:1586-1595.
- Chien A, Edgar DB, Trela JM. 1976.  
Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127:1550-1557.
- Collier JL, Grossman AR. 1994.  
A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *EMBO J* 13:1039-1047.
- Cutter GA, Cutter LS, Featherstone AM, Lohrenz SE. 2001.  
Antimony and arsenic biogeochemistry in the western Atlantic Ocean. *Deep Sea Res Part II* 48:2895-2915.
- D'Autreaux B, Toledano MB. 2007.  
ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:813-824.
- Degerholm J, Gundersen K, Bergman B, Soderback E. 2006.  
Phosphorus-limited growth dynamics in two Baltic Sea cyanobacteria, *Nodularia* sp. and *Aphanizomenon* sp. *FEMS Microbiol Ecol* 58:323-332.
- Dinnbier U, Limpinsel E, Schmidt R, Bakker EP. 1988.  
Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol* 150:348-357.

- Dorador C, Vila I, Imhoff JF, Witzel KP. 2008.  
Cyanobacterial diversity in Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile: an example of geographical dispersion? *FEMS Microbiol Ecol* 64:419-432.
- Dyhrman ST, Haley ST. 2006.  
Phosphorus scavenging in the unicellular marine diazotroph *Crocospaera watsonii*. *Appl Environ Microbiol* 72:1452-1458.
- Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. 1997.  
The carotenoids as anti-oxidants-a review. *J Photochem Photobiol B* 41:189-200.
- Eisenhut M, Kahlon S, Hasse D, Ewald R, Lieman-Hurwitz J, Ogawa T, Ruth W, Bauwe H, Kaplan A, Hagemann M. 2006.  
The plant-like C2 glycolate cycle and the bacterial-like glycerate pathway cooperate in phosphoglycolate metabolism in cyanobacteria. *Plant Physiol* 142:333-342.
- Eisenhut M, Ruth W, Haimovich M, Bauwe H, Kaplan A, Hagemann M. 2008.  
The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiontically to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17199-17204.
- Elhai J, Wolk CP. 1988.  
Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol* 167:747-754.
- Feike J, Jurgens K, Hollibaugh JT, Kruger S, Jost G, Labrenz M. 2012.  
Measuring unbiased metatranscriptomics in suboxic waters of the central Baltic Sea using a new in situ fixation system. *ISME J* 6:461-470.
- Fernandes TA, Iyer V, Apte SK. 1993.  
Differential responses of nitrogen-fixing cyanobacteria to salinity and osmotic stresses. *Appl Environ Microbiol* 59:899-904.
- Fewer DP, Jokela J, Rouhiainen L, Wahlsten M, Koskenniemi K, Stal LJ, Sivonen K. 2009.  
The non-ribosomal assembly and frequent occurrence of the protease inhibitors spumigins in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Mol Microbiol* 73:924-937.
- Foster RA, Kuypers MM, Vagner T, Paerl RW, Musat N, Zehr JP. 2011.  
Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom-cyanobacterial symbioses. *ISME J* 5:1484-1493.
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G. 2009.  
Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annu Rev Plant Biol* 60:455-484.
- Francis G. 1878.  
Poisonous Australian lake. *Nature* 18:11-12.
- Fridovich I. 1995.  
Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64:97-112.

- Funk C, Vermaas W. 1999.  
A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants. *Biochemistry* 38:9397-9404.
- Gao Q, Garcia-Pichel F. 2011.  
An ATP-grasp ligase involved in the last biosynthetic step of the iminomycosporine shinorine in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *J Bacteriol* 193:5923-5928.
- Garcia-Pichel F, Lopez-Cortes A, Nubel U. 2001.  
Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado plateau. *Appl Environ Microbiol* 67:1902-1910.
- Garcia-Pichel F, Sherry ND, Castenholz RW. 1992.  
Evidence for an ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. *Photochem Photobiol* 56:17-23.
- Gorokhova E, Engström-Öst J. 2009.  
Toxin concentration in *Nodularia spumigena* is modulated by mesozooplankton grazers. *Journal of Plankton Research* 31:1235-1247.
- Grosskopf T, Laroche J. 2012.  
Direct and Indirect Costs of Dinitrogen Fixation in *Crocospaera watsonii* WH8501 and Possible Implications for the Nitrogen Cycle. *Front Microbiol* 3:236.
- Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL. 1993.  
The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* 57:725-749.
- Guillard RR, Ryther JH. 1962.  
Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. *Can J Microbiol* 8:229-239.
- Gustavs L, Schumann R, Eggert A, Karsten U. 2009.  
In vivo growth fluorometry: accuracy and limits of microalgal growth rate measurements in ecophysiological investigations. *Aquatic Microbial Ecology* 55:95-104.
- Hackenberg C, Engelhardt A, Matthijs HC, Wittink F, Bauwe H, Kaplan A, Hagemann M. 2009.  
Photorespiratory 2-phosphoglycolate metabolism and photoreduction of O<sub>2</sub> cooperate in high-light acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Planta* 230:625-637.
- Hackenberg C, Kern R, Hüge J, Stal LJ, Tsuji Y, Kopka J, Shiraiwa Y, Bauwe H, Hagemann M. 2011.  
Cyanobacterial lactate oxidases serve as essential partners in N<sub>2</sub> fixation and evolved into photorespiratory glycolate oxidases in plants. *Plant Cell* 23:2978-2990.

- Hagemann M. 2011.  
Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiol Rev* 35:87-123.
- Hagemann M, Eisenhut M, Hackenberg C, Bauwe H. 2010.  
Pathway and importance of photorespiratory 2-phosphoglycolate metabolism in cyanobacteria. *Adv Exp Med Biol* 675:91-108.
- Hagemann M, Marin K. 1999.  
Salt-induced sucrose accumulation is mediated by sucrose-phosphate-synthase in cyanobacteria. *J Plant Physiol* 155:424-430.
- Harke MJ, Berry DL, Ammerman JW, Gobler CJ. 2012.  
Molecular response of the bloom-forming cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to phosphorus limitation. *Microb Ecol* 63:188-198.
- He Q, Dolganov N, Bjorkman O, Grossman AR. 2001.  
The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC6803: expression and function in high light. *J Biol Chem* 276:306–314.
- Hewson I, Poretsky RS, Beinart RA, White AE, Shi T, Bench SR, Moisander PH, Paerl RW, Tripp HJ, Montoya JP, Moran MA, Zehr JP. 2009a.  
In situ transcriptomic analysis of the globally important keystone N<sub>2</sub>-fixing taxon *Crocospira watsonii*. *ISME J* 3:618-631.
- Hewson I, Poretsky RS, Dyhrman ST, Zielinski B, White AE, Tripp HJ, Montoya JP, Zehr JP. 2009b.  
Microbial community gene expression within colonies of the diazotroph, *Trichodesmium*, from the Southwest Pacific Ocean. *ISME J* 3:1286-1300.
- Higo A, Katoh H, Ohmori K, Ikeuchi M, Ohmori M. 2006.  
The role of a gene cluster for trehalose metabolism in dehydration tolerance of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology* 152:979-987.
- Hihara Y, Kamei A, Kanehisa M, Kaplan A, Ikeuchi M. 2001.  
DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* 13:793-806.
- Huber AL. 1984.  
*Nodularia* (cyanobacteriaceae) akinetes in the sediments of the peel-harvey estuary, Western australia: potential inoculum source for nodularia blooms. *Appl Environ Microbiol* 47:234-238.
- Huber AL. 1985.  
Factors Affecting the Germination of Akinetes of *Nodularia spumigena* (Cyanobacteriaceae). *Appl Environ Microbiol* 49:73-78.
- Huber V, Wagner C, Gerten D, Adrian R. 2012.  
To bloom or not to bloom: contrasting responses of cyanobacteria to recent heat waves explained by critical thresholds of abiotic drivers. *Oecologia* 169:245-256.

- Jansen F, Neumann T, Schmidt M. 2004.  
Interannual variability in cyanobacteria blooms in the Baltic Sea controlled by wintertime hydrographic conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 275:59–68.
- Janson S, Carpenter EJ, Bergman B. 1994.  
Fine structure and immunolocalisation of proteins in *Aphanizomenon* sp. from the Baltic Sea. *Eur J Phycol* 29:203-211.
- Jansson S. 1999.  
A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*/IT>. *Trends Plant Sci* 4:236-240.
- Kaplan A, Badger MR, Berry JA. 1980.  
Photosynthesis and intracellular inorganic carbon pool in the blue-green algae *Anabaena variabilis*: response to external CO<sub>2</sub> concentration. *Planta* 149:219–226.
- Kaplan A, Reinhold L. 1999.  
Co<sub>2</sub> Concentrating Mechanisms in Photosynthetic Microorganisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:539-570.
- Karl DM, Bjorkman KM, Dore JE, Fujieki L, Hebel DV, Houlihan T, Letelier RM, Tupas LM. 2001.  
Ecological nitrogen-to-phosphorus stoichiometry at station ALOHA. *Deep Sea Res. Part II* 48:1529–1566.
- Karradt A, Sobanski J, Mattow J, Lockau W, Baier K. 2008.  
NblA, a key protein of phycobilisome degradation, interacts with ClpC, a HSP100 chaperone partner of a cyanobacterial Clp protease. *J Biol Chem* 283:32394-32403.
- Karsten U, Klimant I, Holst G. 1996.  
A new in vivo fluorimetric technique to measure growth of adhering phototrophic microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 62:237-243.
- Kempf B, Bremer E. 1998.  
Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* 170:319-330.
- Kern R, Bauwe H, Hagemann M. 2011.  
Evolution of enzymes involved in the photorespiratory 2-phosphoglycolate cycle from cyanobacteria via algae toward plants. *Photosynth Res* 109:103-114.
- Kilian O, Steunou AS, Grossman AR, Bhaya D. 2008.  
A novel two domain-fusion protein in cyanobacteria with similarity to the CAB/ELIP/HLIP superfamily: evolutionary implications and regulation. *Mol Plant* 1:155-166.
- Kim JH, Suh KH. 2005.  
Light-dependent expression of superoxide dismutase from cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Arch Microbiol* 183:218-223.

- Kirilovsky D. 2007.  
Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism. *Photosynth Res* 93:7-16.
- Kirschvink JL, Kopp RE. 2008.  
Palaeoproterozoic ice houses and the evolution of oxygen-mediating enzymes: the case for a late origin of photosystem II. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:2755-2765.
- Klähn S, Hohne A, Simon E, Hagemann M. 2010.  
The gene *ssl3076* encodes a protein mediating the salt-induced expression of *ggpS* for the biosynthesis of the compatible solute glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 192:4403-4412.
- Klähn S, Steglich C, Hess W, Hagemann M. 2009.  
Glucosylglycerate: a secondary compatible solute common to marine cyanobacteria from nitrogen-poor environments. *Environmental Microbiology*.
- Kononen K. 1992.  
Dynamics of the toxic cyanobacterial blooms in the Baltic Sea. *Finnish Marine Research* 261:3-36.
- Korpinen S, Karjalainen M, Viitasalo M. 2006.  
Effects of cyanobacteria on survival and reproduction of the littoral crustacean *Gammarus zaddachi* (Amphipoda). *Hydrobiologia* 559:285-295.
- Kortje KH, Paulus U, Ibsch M, Rahmann H. 1996.  
Imaging of thick sections of nervous tissue with energy-filtering transmission electron microscopy. *J Microsc* 183:89-101.
- Kotai J. 1972.  
Instructions for Preparation of Modified Nutrient Solution Z8 for Algae. Publication B-11\69. Blindern, Oslo: Norwegian Institute for Water Research.
- Kulaev IS. 1979.  
The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley & Sons, Inc, New York
- Laamanen M, Kuosa H. 2005.  
Annual variability of biomass and heterocysts of the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* in the Baltic Sea with reference to *Anabaena* spp. and *Nodularia spumigena*. *Boreal Environ. Res.* 10:19-30.
- Laanemets J, Kononen K, Pavelson J, Poutanen E-L. 2004.  
Vertical location of seasonal nutriclines in the western Gulf of Finland. *J. Mar. Sys.* 52:1-13.
- Laanemets J, Lilover M-J, Raudsepp U, Autio R, Vahtera E, Lips I, Lips U. 2006.  
A fuzzy logic model to describe the cyanobacteria *Nodularia spumigena* blooms in the Gulf of Finland, Baltic Sea. *Hydrobiologia* 554:31-45.

- Larsson U, Hajdu S, Walve J, Elmgren R. 2001.  
Baltic Sea nitrogen fixation estimated from the summer increase in upper mixed layer total nitrogen. *Limnol. Oceanogr.* 46:811–820.
- Lass HU, Mohrholz V, Nausch G, Siegel H. 2010.  
On phosphate pumping into the surface layer of the eastern Gotland Basin by upwelling. *J. Mar. Syst.* 80:71–89.
- Latifi A, Ruiz M, Zhang CC. 2009.  
Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 33:258–278.
- Leflaive J, Ten-Hage L. 2007.  
Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biol.* 52:199–214.
- Lehtimäki J, Moisander P, Sivonen K, Kononen K. 1997.  
Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two Baltic Sea cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1647–1656.
- Lesser MP. 2006.  
Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68:253–278.
- Lignell R, Seppälä J, Kuuppo P, Tamminen T, Andersen T, Gismervik I. 2003.  
Beyond bulk properties: Responses of coastal summer plankton communities to nutrient enrichment in the northern Baltic Sea. *Limnol. Oceanogr.* 48:189–209.
- Liu Z, Häder DP, Sommaruga R. 2004.  
Occurrence of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J Plankton Res* 26:963–966.
- Long S, Humphries S. 1994.  
Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:633–662.
- Lorimer GH, Andrews TJ. 1981.  
The C<sub>2</sub> chemo- and photorespiratory carbon oxydation cycle. In MD Hatch, NK Boardman, eds, *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise: Photosynthesis*, Vol 8. Academic Press, New York, :329–374.
- Los DA, Suzuki I, Zinchenko VV, Murata N. 2008.  
Stress responses in *Synechocystis*: Regulated genes and regulatory systems. . In: Herrero A, Flores E (eds) *The cyanobacteria - molecular biology, genomics and evolution*, Caister Academic Press, Norfolk, :117–158
- Ludwig M, Bryant DA. 2011.  
Transcription Profiling of the Model Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002 by Next-Gen (SOLiD) Sequencing of cDNA. *Front Microbiol* 2:41.
- Lyra C, Laamanen M, Lehtimäki JM, Surakka A, Sivonen K. 2005.  
Benthic cyanobacteria of the genus *Nodularia* are non-toxic, without gas vacuoles, able to glide and genetically more diverse than planktonic *Nodularia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:555–568.



- Marin K, Kanesaki Y, Los DA, Murata N, Suzuki I, Hagemann M. 2004.  
Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol* 136:3290-3300.
- Martinez A, Tyson GW, Delong EF. 2010.  
Widespread known and novel phosphonate utilization pathways in marine bacteria revealed by functional screening and metagenomic analyses. *Environ Microbiol* 12:222-238.
- McGinn PJ, Price GD, Maleszka R, Badger MR. 2003.  
Inorganic carbon limitation and light control the expression of transcripts related to the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Plant Physiol* 132:218-229.
- McLaggan D, Naprstek J, Buurman ET, Epstein W. 1994.  
Interdependence of K<sup>+</sup> and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269:1911-1917.
- Mitschke J, Georg J, Scholz I, Sharma CM, Dienst D, Bantscheff J, Voss B, Steglich C, Wilde A, Vogel J, Hess WR. 2011a.  
An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:2124-2129.
- Mitschke J, Vioque A, Haas F, Hess WR, Muro-Pastor AM. 2011b.  
Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC7120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:20130-20135.
- Moffitt MC, Blackburn SI, Neilan BA. 2001.  
rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus *Nodularia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:505-512.
- Mohlin M, Wulff A. 2009.  
Interaction effects of ambient UV radiation and nutrient limitation on the toxic cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Microb Ecol* 57:675-686.
- Moisander PH, McClinton E, 3rd, Paerl HW. 2002.  
Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microb Ecol* 43:432-442.
- Morin R, Bainbridge M, Fejes A, Hirst M, Krzywinski M, Pugh T, McDonald H, Varhol R, Jones S, Marra M. 2008.  
Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. *Biotechniques* 45:81-94.
- Mulkidjanian AY, Koonin EV, Makarova KS, Mekhedov SL, Sorokin A, Wolf YI, Dufresne A, Partensky F, Burd H, Kaznadzey D, Haselkorn R, Galperin MY. 2006.  
The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13126-13131.

- Mulkidjanian AY, Kozlova MA, Cherepanov DA. 2005.  
Ubiquinone reduction in the photosynthetic reaction centre of *Rhodobacter sphaeroides*: interplay between electron transfer, proton binding and flips of the quinone ring. *Biochem Soc Trans* 33:845-850.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987.  
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Musial A, Plinski M. 2003.  
Influence of salinity of the growth of *Nodularia spumigena* Mertens. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 32:45-52.
- Nausch M, Nausch G. 2006.  
Bioavailability of dissolved organic phosphorus in the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 321:9–17.
- Nausch M, Nausch G, Wasmund N, Nagel K. 2008.  
Phosphorus pool variations and their relation to cyanobacterial development in the Baltic Sea: a three year study. *J. Mar. Syst.* 71:99-111.
- Nield J, Morris EP, Bibby TS, Barber J. 2003.  
Structural analysis of the photosystem I supercomplex of cyanobacteria induced by iron deficiency. *Biochemistry* 42:3180-3188.
- Niemi A. 1979.  
Blue-green algal blooms and N:P ratio in the Baltic Sea. *Acta Bot. Fenn.* 110:57-61.
- Nishiyama Y, Yamamoto H, Allakhverdiev SI, Inaba M, Yokota A, Murata N. 2001.  
Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO J* 20:5587-5594.
- Niyogi KK. 1999.  
PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:333-359.
- Novak JF, Stirnberg M, Roenneke B, Marin K. 2011.  
A novel mechanism of osmosensing, a salt-dependent protein-nucleic acid interaction in the cyanobacterium *Synechocystis* Species PCC 6803. *J Biol Chem* 286:3235-3241.
- Nübel U, Garcia-Pichel F, Clavero E, Muyzer G. 2000.  
Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ Microbiol* 2:217-226.
- Ojaveer E, Simm M, Balode M, Purina I, Suursaar U. 2003.  
Effect of *Microcystis aeruginosa* and *Nodularia spumigena* on survival of *Eurytemora affinis* and the embryonic and larval development of the Baltic herring *Clupea harengus membras*. *Environ Toxicol* 18:236-242.

- Orchard ED, Webb EA, Dyhrman ST. 2009.  
Molecular analysis of the phosphorus starvation response in *Trichodesmium* spp. *Environ Microbiol* 11:2400-2411.
- Oren A, Gunde-Cimerman N. 2007.  
Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiol Lett* 269:1-10.
- Ottensmeyer FP, Schmidt EE, Olbrecht AJ. 1973.  
Image of a sulfur atom. *Science* 179:175-176.
- Pääkkönen J-P, Rönkkönen S, Karjalainen M, Viitasalo M. 2008.  
Physiological effects in juvenile three-spined sticklebacks feeding on toxic cyanobacterium *Nodularia spumigena*-exposed zooplankton. *J. Fish Biol.* 72:485-499.
- Paerl HW, Huisman J. 2008.  
Climate. Blooms like it hot. *Science* 320:57-58.
- Paerl HW, Paul VJ. 2012.  
Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res* 46:1349-1363.
- Pitt FD, Mazard S, Humphreys L, Scanlan DJ. 2010.  
Functional characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 *pst1* and *pst2* gene clusters reveals a novel strategy for phosphate uptake in a freshwater cyanobacterium. *J Bacteriol* 192:3512-3523.
- Ploug H, Adam B, Musat N, Kalvelage T, Lavik G, Wolf-Gladrow D, Kuypers MM. 2011.  
Carbon, nitrogen and O<sub>2</sub> fluxes associated with the cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea. *ISME J* 5:1549-1558.
- Porchia AC, Salerno GL. 1996.  
Sucrose biosynthesis in a prokaryotic organism: Presence of two sucrose-phosphate synthases in *Anabaena* with remarkable differences compared with the plant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13600-13604.
- Porra RJ. 2002.  
The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth Res* 73:149-156.
- Price GD, Maeda S, Omata T, R. BM. 2002.  
Modes of active inorganic carbon uptake in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. *Functional Plant Biology* 29:131-149.
- Pushparaj B, Pelosi E, Torzillo G, Carlozzi P, Sacchi A, Materassi R. 1995.  
Growth physiology of a marine nitrogen-fixing cyanobacterium (*Nodularia harveyana*) in outdoor culture. *J Appl Phycol* 6:533-537.

- Ray JM, Bhaya D, Block MA, Grossman AR. 1991.  
Isolation, transcription, and inactivation of the gene for an atypical alkaline phosphatase of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 173:4297-4309.
- Record MT, Jr., Courtenay ES, Cayley S, Guttman HJ. 1998.  
Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. *Trends Biochem Sci* 23:190-194.
- Reddy BR, Apte SK, Thomas J. 1989.  
Enhancement of cyanobacterial salt tolerance by combined nitrogen. *Plant Physiol* 89:204-210.
- Reed RH, Borowitzka LJ, Mackay MA, Chudek JA, Foster R, Warr SRC, Moore DJ, Stewart WDP. 1986.  
Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 39:51-56.
- Rezanka T, Temina M, Tolstikov AG, Dembitsky VM. 2004.  
Natural microbial UV radiation filters--mycosporine-like amino acids. *Folia Microbiol (Praha)* 49:339-352.
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. 1979.  
Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111:1-61.
- Roleda MY, Mohlin M, Pattanaik B, Wulff A. 2008.  
Photosynthetic response of *Nodularia spumigena* to UV and photosynthetically active radiation depends on nutrient (N and P) availability. *FEMS Microbiol Ecol* 66:230-242.
- Rydin E, Hyenstrand P, Gunnerhed M, Blomqvist P. 2002.  
Nutrient limitation of cyanobacterial blooms: an enclosure experiment from the coastal zone of the NW Baltic proper. *Mar Ecol Prog Ser* 239:31-36.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977.  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Scanlan DJ, Mann NH, Carr NG. 1993.  
The response of the picoplanktonic marine cyanobacterium *Synechococcus* species WH7803 to phosphate starvation involves a protein homologous to the periplasmic phosphate-binding protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 10:181-191.
- Scanlan DJ, Ostrowski M, Mazard S, Dufresne A, Garczarek L, Hess WR, Post AF, Hagemann M, Paulsen I, Partensky F. 2009.  
Ecological genomics of marine picocyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:249-299.

- Schatz D, Keren Y, Vardi A, Sukenik A, Carmeli S, Borner T, Dittmann E, Kaplan A. 2007.  
Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environ Microbiol* 9:965-970.
- Senft WH. 1978.  
Dependence of light-saturated rates of algal photosynthesis on intracellular concentrations of phosphorus. *Limnology and Oceanography* 23:709-718.
- Singh S, Stavrinos J, Christendat D, Guttman DS. 2008.  
A phylogenomic analysis of the shikimate dehydrogenases reveals broadscale functional diversification and identifies one functionally distinct subclass. *Mol Biol Evol* 25:2221-2232.
- Singh SP, Häder D-P, Sinha RP. 2012.  
Bioinformatics evidence for the transfer of mycosporine-like amino acid core (4-deoxygadusol) synthesizing gene from cyanobacteria to dinoflagellates and an attempt to mutate the same gene (YP\_324358) in *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Gene* 500:155–163.
- Sinha RP, Klisch M, Helbling EW, Häder D-P. 2001.  
Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. *J Photochem Photobiol B* 60:129-135.
- Sivonen K, Halinen K, Sihvonen LM, Koskeniemi K, Sinkko H, Rantasarkka K, Moisander PH, Lyra C. 2007.  
Bacterial diversity and function in the Baltic Sea with an emphasis on cyanobacteria. *Ambio* 36:180-185.
- Sivonen K, Jones G. 1999.  
Cyanobacterial toxins. In Chorus, I. and Bartram, J. (eds),. *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management.*:E & FN Spon, 41–111.
- Stal LJ. 2009.  
Is the distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria in the oceans related to temperature? *Environ Microbiol* 11:1632-1645.
- Stal LJ, Walsby AE. 2000.  
Photosynthesis and nitrogen fixation in a cyanobacterial bloom in the Baltic Sea. *Eur J Phycol* 35:97-108.
- Stewart WD, Pearson HW. 1970.  
Effects of aerobic and anaerobic conditions on growth and metabolism of blue-green algae. *Proc R Soc London Ser. B* 175:293-311.
- Su ZC, Olman V, Xu Y. 2007.  
Computational prediction of Pho regulons in cyanobacteria. *BMC Genomics* 8:156.
- Suikkanen S, Kaartokallio H, Hällfors S, Huttunen M, Laamanen M. 2010.  
Life cycle strategies of bloom-forming, filamentous cyanobacteria in the Baltic Sea. *Deep-Sea Research II* 57:199 - 209.

- Suikkanen S, Laamanen M, Huttunen M. 2007.  
Long-term changes in summer phytoplankton communities of the open northern Baltic Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 71:580–592.
- Takahashi S, Bauwe H, Badger M. 2007.  
Impairment of the Photorespiratory Pathway Accelerates Photoinhibition of Photosystem II by Suppression of Repair But Not Acceleration of Damage Processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144:487-494.
- Tamminen T, Andersen T. 2007.  
Seasonal phytoplankton nutrient limitation patterns as revealed by bioassays over Baltic Sea gradients of salinity and eutrophication. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 340:121–138.
- Tamoi M, Miyazaki T, Fukamizo T, Shigeoka S. 2005.  
The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions. *Plant J* 42:504-513.
- Thompson AW, Foster RA, Krupke A, Carter BJ, Musat N, Vaultot D, Kuypers MM, Zehr JP. 2012.  
Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science* 337:1546-1550.
- Tzvetkova-Chevolleau T, Franck F, Alawady AE, Dall'Osto L, Carriere F, Bassi R, Grimm B, Nussaume L, Havaux M. 2007.  
The light stress-induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 50:795-809.
- Vahtera E, Laamanen M, Rintala JM. 2007.  
Use of different phosphorus sources by the bloom-forming cyanobacteria *Aphanizomenon flos-aquae* and *Nodularia spumigena*. *Aquatic Microbial Ecology* 46:225-237.
- Vahtera E, Laanemets J, Pavelson J, Huttunen M, Kononen K. 2005.  
Effect of upwelling on the pelagic environment and bloom-forming cyanobacteria in the western Gulf of Finland, Baltic Sea. *Journal of Marine Systems* 58:67–82.
- van Dok W, Hart BT. 1997.  
Akinete Germination in *Anabaena circinalis* (Cyanophyta). *J. Phycol.* 33:12-17.
- Vassilakaki M, Pflugmacher S. 2008.  
Oxidative stress response of *Synechocystis* sp. (PCC6803) due to exposure to microcystin-LR and cellfree cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR. *J. Appl. Phycol.* 20 (3):219–225.
- Voss B, Bolhuis H, Fewer DP, Kopf M, Möke F, Haas F, El-Shehawy R, Hayes P, Bergman B, Sivonen K, Dittmann E, Scanlan DJ, Hagemann M, Stal LJ, Hess WR. 2013.  
Insights into the physiology and ecology of the brackish-water-adapted Cyanobacterium *Nodularia spumigena* CCY9414 based on a genome-transcriptome analysis. *PLoS One* 8:e60224.

- Wallström K, Johansson S, Larsson U. 1992.  
Effects of nutrient enrichment on planktonic blue-green algae in the Baltic Sea. *Acta Phytogeogr. Suec.* 78:25–31.
- Walve J, Larsson U. 2007.  
Blooms of Baltic Sea *Aphanizomenon* sp. (Cyanobacteria) collapse after internal phosphorus depletion. *Aquat. Microb. Ecol.* 49:57–69.
- Wang H, Sivonen K, Rouhiainen L, Fewer DP, Lyra C, Rantala-Ylinen A, Vestola J, Jokela J, Rantasarkka K, Li Z, Liu B. 2012.  
Genome-derived insights into the biology of the hepatotoxic bloom-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 90. *BMC Genomics* 13:613.
- Warburg O, Christian W. 1942.  
Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.* 310:384-421.
- Wasmund N. 1997.  
Occurrence of cyanobacterial blooms in the Baltic Sea in relation to environmental conditions. *Int Rev Ges Hydrobiol* 82:169-184.
- Wasmund N, Nausch G, Schneider B. 2005.  
Primary production rates calculated by different concepts - an opportunity to study the complex production system in the Baltic Proper. *J. sea res.* 54:244-255.
- Wilson A, Ajlani G, Verbavatz J, Vass I, Kerfeld CA, Kirilovsky D. 2006.  
A Soluble Carotenoid Protein Involved in Phycobilisome-Related Energy Dissipation in Cyanobacteria. *Plant Cell* 18:992-1007.
- Wulff A, Mohlin M, Sundback K. 2007.  
Intraspecific variation in the response of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* to moderate UV-B radiation. *Harmful Algae* 6:388–399.
- Yan D, Ikeda TP, Shauger AE, Kustu S. 1996.  
Glutamate is required to maintain the steady-state potassium pool in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6527-6531.
- Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D. 2004.  
A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* 21:809-818.
- Zilliges Y, Kehr JC, Meissner S, Ishida K, Mikkat S, Hagemann M, Kaplan A, Borner T, Dittmann E. 2011.  
The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of microcystis under oxidative stress conditions. *PLoS One* 6:e17615.

## **Danksagung**

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Hermann Bauwe danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit in der Abteilung für Pflanzenphysiologie anfertigen zu können. Sein Vertrauen, das er mir mit der Vergabe des Dissertationsthemas entgegen brachte sowie Anregungen und kritische Kommentare haben zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Hagemann für seine vielen Anregungen, seine Offenheit für Fragen und Probleme, aber auch sein Optimismus in allen Phasen meiner Arbeit. „Wenn ich du wäre, würde ich ...“ – ich vermisse es schon jetzt!

Herrn Dr. Norbert Wasmund danke ich für die Bereitstellung von Freilandproben.

Ein großer Dank geht auch an Gerhard Fulda, der mich mit großer Leidenschaft bei den elektromikroskopischen Aufnahmen unterstützte.

Für die vielfältige Unterstützung, insbesondere während meiner Einarbeitung im Labor danke ich Dr. Claudia Hackenberg, Dr. Stephan Klähn und Dr. Dirk Hasse.

Kathrin, Manja, Klaudia und Ursula danke ich für die vielen kleinen „Selbstverständlichkeiten“, die das Arbeiten im Labor so angenehm machten. Ein besonders herzliches Dankeschön für ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfestellung bei meinen ersten Schritten in einem molekularbiologischen Labor, bis zum Ende meiner praktischen Arbeiten.

Aber auch der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die hervorragende Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Laboralltag danken. Gern werde ich mich an so einige Ausflüge und Grillabende zurückerinnern.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Interdisziplinären Fakultät der Universität Rostock.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Freunden und vielen Weggefährten, mit denen ich wunderschöne Jahre in Rostock erleben durfte.

Über allem stehen natürlich meine Eltern, die mein Studium erst möglich gemacht haben und auf deren Unterstützung ich immer bauen konnte. Sie haben mich bei all meinen Vorhaben unterstützt und waren stets an meiner Seite.



## Lebenslauf

Fred Möke  
Borwinstraße 18  
18057 Rostock  
fred.moeke@uni-rostock.de  
26.12.1982 geboren in Kyritz

Schulbesuch:	02.09.1989 bis 28.06.1995 Grundschule 14.08.1995 bis 28.06.2002 Gymnasium, Friedrich Ludwig Jahn. Perleberger Str. 6, Kyritz
Zivildienst:	01.07.2002 bis 30.04.2003 AWO Service- Haus Kyritz Holzhausener Str. 4, Kyritz
Studium:	Okt. 2003 Universität Rostock Studiengang Biologie Okt. 2009 Abschluss als Diplombiologe
Dissertation:	Nov. 2009 Beginn der Promotion

**Publikationen**

**Möke F**, Wasmund N, Bauwe H, Hagemann M (2013) Salt acclimation of *Nodularia spumigena* CCY9414 – a cyanobacterium adapted to brackish water. *Aquatic Microbial* Vol. 70: 207–214

Voß B, Bolhuis H, Fewer DP, Kopf M, **Möke F**, et al. (2013) Insights into the physiology and ecology of the brackish-water-adapted cyanobacterium *Nodularia spumigena* CCY9414 based on a genome-transcriptome analysis. *PLOS ONE* 8: e60224. doi:10.1371/journal.pone.0060224

## **Erklärung**

### **1. Erklärung:**

Ich beantrage hiermit unwiderruflich, gem. §12 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock, die mündliche Prüfung in Form eines öffentlichen wissenschaftlichen Kolloquiums abzulegen.

Rostock, September 2013

Fred, Möke

### **2. Erklärung:**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, September 2013

Fred, Möke

### **3. Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 4 Abs. 1 (k) der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Rostock, September 2013

Fred, Möke

## Anhang

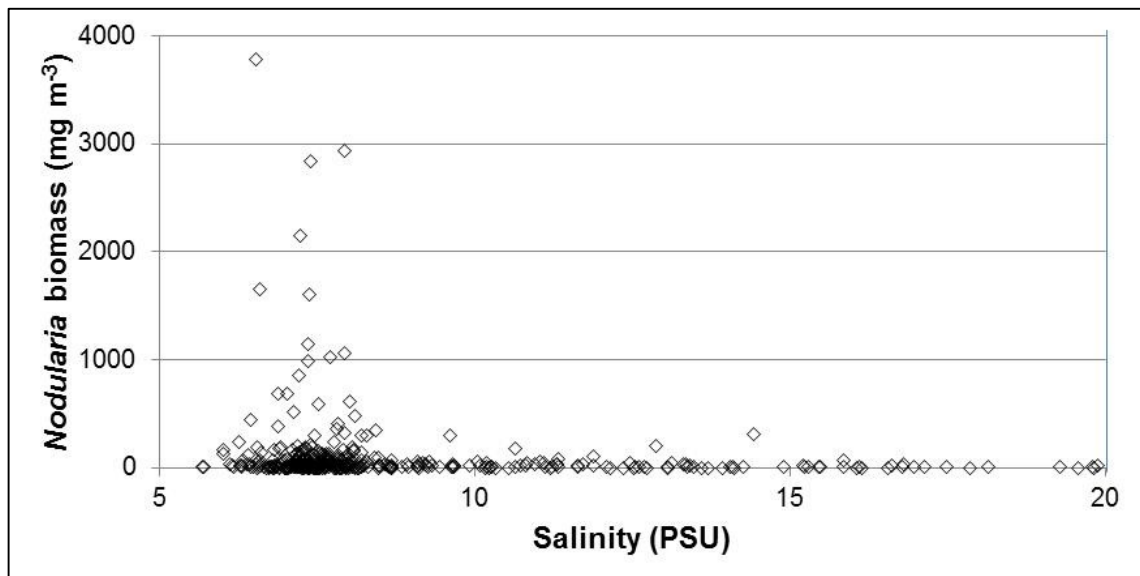
**Tabelle I Primerliste.** Verwendete Oligonukleotide zur Erstellung von phylogenetischen Verhältnissen sowie Expressionsanalysen.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Einsatz des Primers	Acession locus tag
1	CYA 781 R	GACTACWGGGGTATCTAATCCC WTT	Degenerierte Primer für das 16S rRNA Gen von Cyanobakterien	
2	CYA 359 F	GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG		
3	Phosphoglyk fw	TTACCTCTAGGGAAATCC	Phosphoglycolat -Phosphatase	N9414_22268 nsp48780
4	Phoshoglyk rev	TATCTCTGGTTTCATCCC		
5	Glyk fw	GCGAATTCTGCCCACTCAC	Glyceratkinase	N9414_02416 nsp44980
6	Glyk rev	GTCCTCGCCAAATCAATCGG		
7	GlyCarbo fw	GACTCAATCGCCAGTCGTC	Glyoxylat Carboligase	N9414_04590 nsp1450
8	GlyCarbo rev	AGGCTGTAGCGATGCCTGTG		
9	SDH fw	CTAGCAAGCCGGAATTTCCC	Semialdehyd- Dehydrogenase	N9414_23748 nsp48540
10	SDH rev	GGTGGTTAGCAGCAGCTAAG		
11	T-Protein fw	CAACCAGGTCAAGCGCAATAC	T-Protein	N9414_10982 nsp33150
12	T-Protein rev	ACGCTTGGAGGTGTCCAAAGG		
13	SbtA fw	GTGCCGTGAGTGGTTCTAC	SbtA (solaneyl diphosphate synthase)	N9414_20320 nsp19930
14	SbtA rev	ATAGGGCAGATCCCTGGAG		
15	NDH-1 fw	TGATTCTGGCGATGTATGGC	NDH-1 <sub>3</sub>	N9414_10333 nsp10420
16	NDH-1 rev	CAGGAACCCAGCGTATAAGG		
17	nifH fw	AGGTGCGTACTCGTTGACAG	nifH (N)	N9414_15060 nsp40760
18	nifH rev	GCGATGCCAATAAGAGAAGG		
19	sodB fw	GACTCCTCTAAGGTGGGAATC	sodB (generell Stress)	N9414_12713 nsp31650
20	sodB rev	CCCAGACATCCAAGGTTAAG		
21	isiA fw	GGGTCAAGCGCGTAAATTC	isiA (Eisenregulierter Arm)	N9414_11549 nsp37510
22	isiA rev	CAAATCCCGCCACCAATTAG		
23	fadA fw	CTCACCACGGCTTAAAGCTTC	fadA (Eisen ABC- Transporter)	N9414_02931 nsp19100

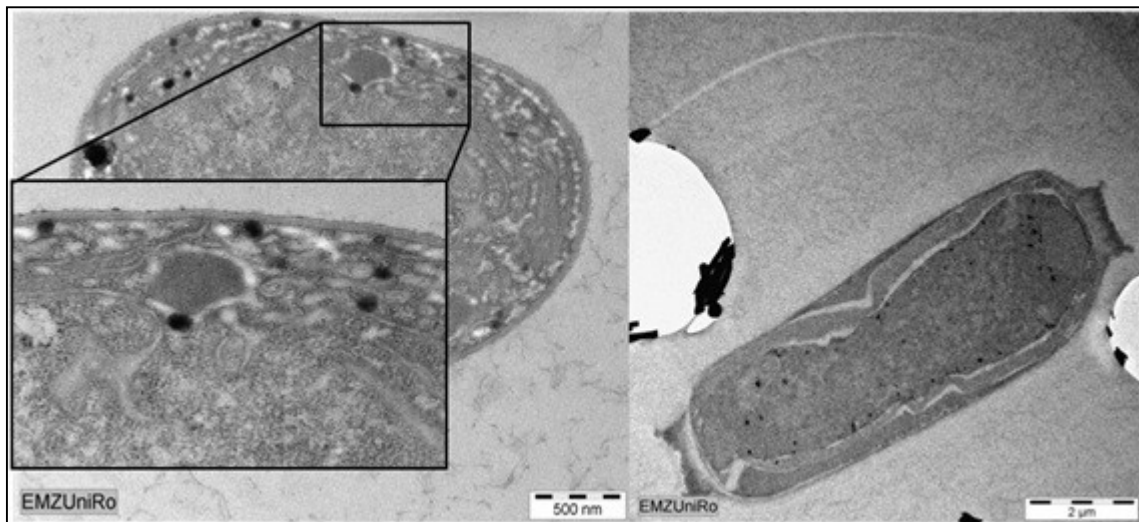
24	fadA rev	CGTTCTCCAGAGGGACAATG		
25	ocp fw	GGATCAACACCCATGTTGAC	ocp (orange carotin Protein)	N9414_12098 nsp46020
26	ocp rev	ACGGATGCAGTTTGCTGAAG		
27	rnpB fw	AACTATGACTACCCGCCAGCC	rnpB (Ribonuklease P)	N9414_00815 nsp30860
28	rnpB rev	GGCTTTGCCCAAAGCAAATCG		
29	alkphos_1_fw	TAGCCCTAATGGTCAACCTC	Alkalischen Phosphatase	N9414_21345 nsp7010
30	alkpphos_1_rev	CCTGTACTCCCAAAGCATTC		
31	ABCppts_fw	ATGTCTTGACTGGGTGTCTC	ABC Transporter für Pyrophosphat	N9414_21125 nsp7470
32	ABCppts_rev	CGTAACGCATAGCCAAGTTC		
33	PstS_fw	TACCAGTTCCGACTCTAC	PstS Phosphat ABC Transporter (periplasmic phosphate-binding protein Pst)	N9414_15502 nsp28900
34	PstS_rev	GATGCTGCTATGACAGAC		
35	pkk_fw	TCATCCCTTCCGCGTTACCC	Polyphosphat-Kinase	N9414_09946 nsp10230
36	pkk_rev	ACAGACTGGCGTGGTGGTTC		
37	spsSP_fw	CCCATGATTATGGCGCTTTC	Saccharosephosphat-Synthase (spsA)	N9414_18730 nsp8740
38	spsSP_rev	GCTCAGTTAATGCGGGATTG		
39	ndaF_fw	ATTGCGGCAGAAACGGCTGCT	Nodularin-Synthetase (ndaF-ORF)	N9414_07696 nsp42160
40	ndaF_rev	ATCGGGTTTACGGCTTTGCACT		
41	L-protein fw	CAGCCTCAAACGTCTGAAAGTC	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase	nsp39370 N9414_03266
42	L-protein rev	TGGTCTAGGCTTCAATCATGG		

**Tabelle II: ASN3-Medium.** Zusammensetzung des Kultivierungsmediums nach Rippka et al. (1979).

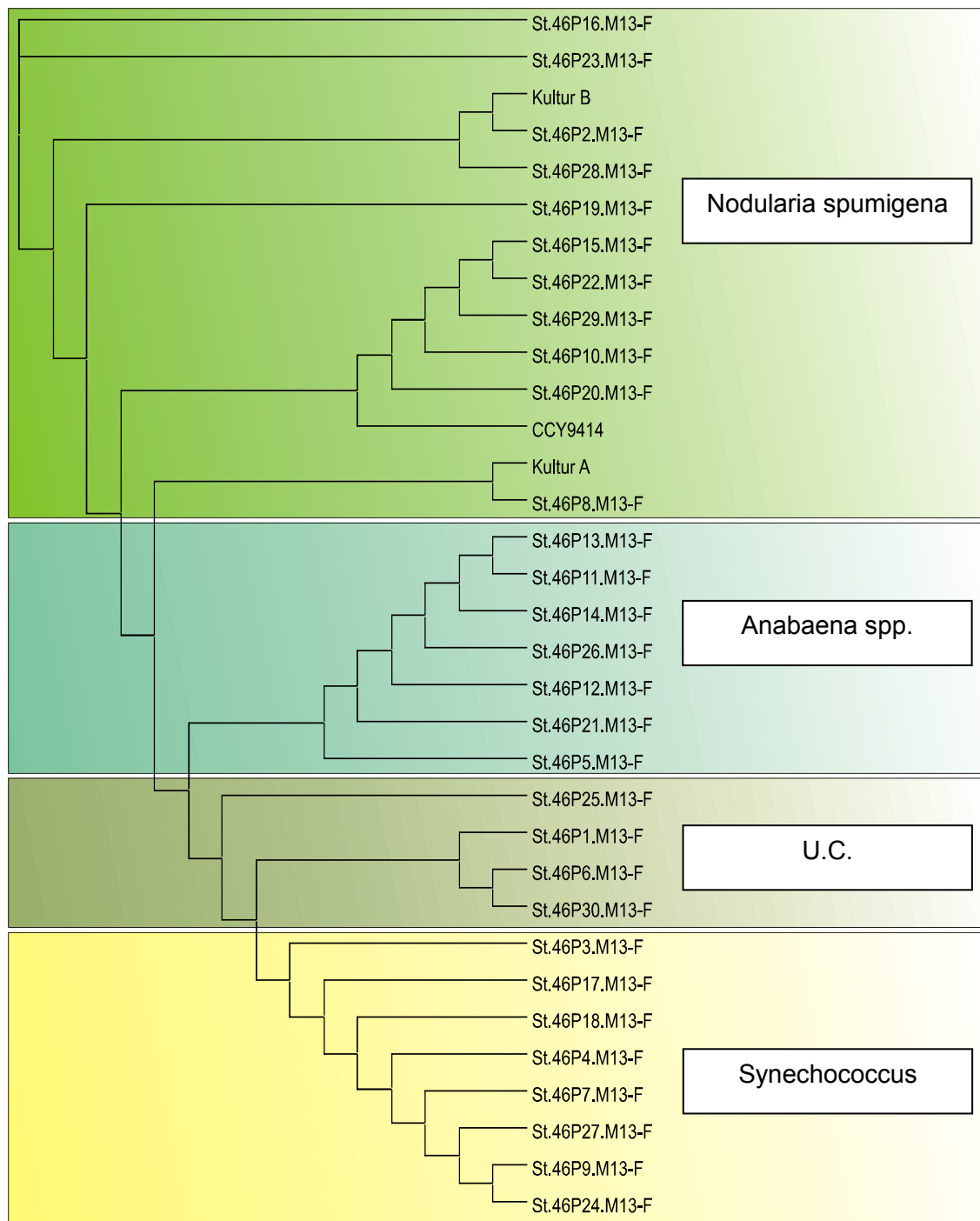
Chemikalien	MG	Finale Konz. (mM)	entspricht Konz. (g/l)	g Einwaage Stammlsg	ml A.dest Volumen Stammlsg	ml Stammlsg . pro l Medium
<b>Stammlösung 1</b>						
Citric acid Monohydrat $C_6H_8O_7 \times H_2O$	210,1	0,0142	0,003	0,15		
Ferric ammonium citrat Fe-NH <sub>4</sub> -citrat	-		0,003	0,15	100 ml	2 ml
EDTA Dinatriumsalz $C_{10}H_{14}O_8N_2 \times 2H_2O$	372,2	0,0013	0,0005	0,025		
<b>Stammlösung 2</b>						
NaNO <sub>3</sub>	84,99	8,82	0,75	15		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174,18	0,115	0,02	0,4	1 l	50 ml
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	246,5	14,2	3,5	70		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105,99	0,1887	0,02	0,4		
<b>Stammlösung 3</b>						
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	147	3,4	0,5	1		
NaCl	58,44	427,79	25	50	1 l	500 ml
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	203,3	9,837	2,0	4		
KCl	74,55	6,7	0,5	1		
<b>Spurenelemente</b>						
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,83	46,25	2,86			
MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	197,9	9,146	1,81			
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	287,5	0,772	0,222		1 l	1 ml
NaMoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	241,9	1,612	0,390			
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	249,69	0,316	0,079			
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	291	0,17	0,0494			
<b>1 M TES Puffer KOH</b> pH 7,5	229,2	20		114,63 g	In 400 ml lösen, mit KOH pH 7,5 einstellen auf 500 ml auffüllen	20 ml
<b>Vitamin B<sub>12</sub></b>						Nach dem Autoklavieren dazu: 10 µg/l



**Abbildung I: *Nodularia spumigena* biomass** in the natural salt gradient of the central and western Baltic Sea at 0-10 m depth between 1979 and 2005. Daten basieren auf dem Baltic Monitoring Program der Helsinki-Kommission (HELCOM).

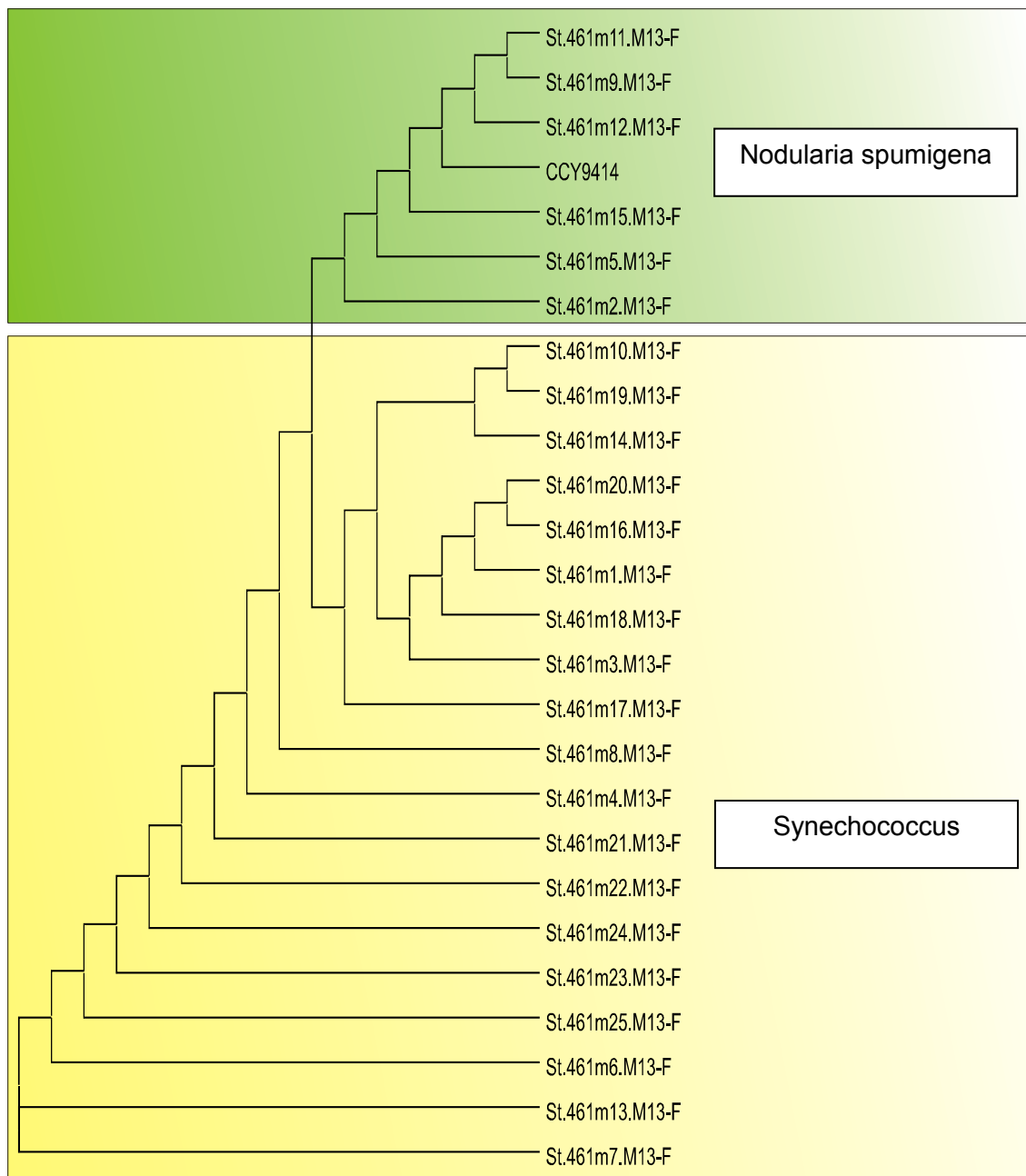


**Abbildung II: TEM-Aufnahmen von *Aphanizomenon*-Fäden aus einer beprobten Freilandblüte.** Die Bilder zeigen Zellen aus einer *Aphanizomenon*-dominierten Blüte. Sichtbar sind Akkumulationen von polyP-Granula, ohne ein detektierbares anorganisches Phosphat in der Wasserprobe.

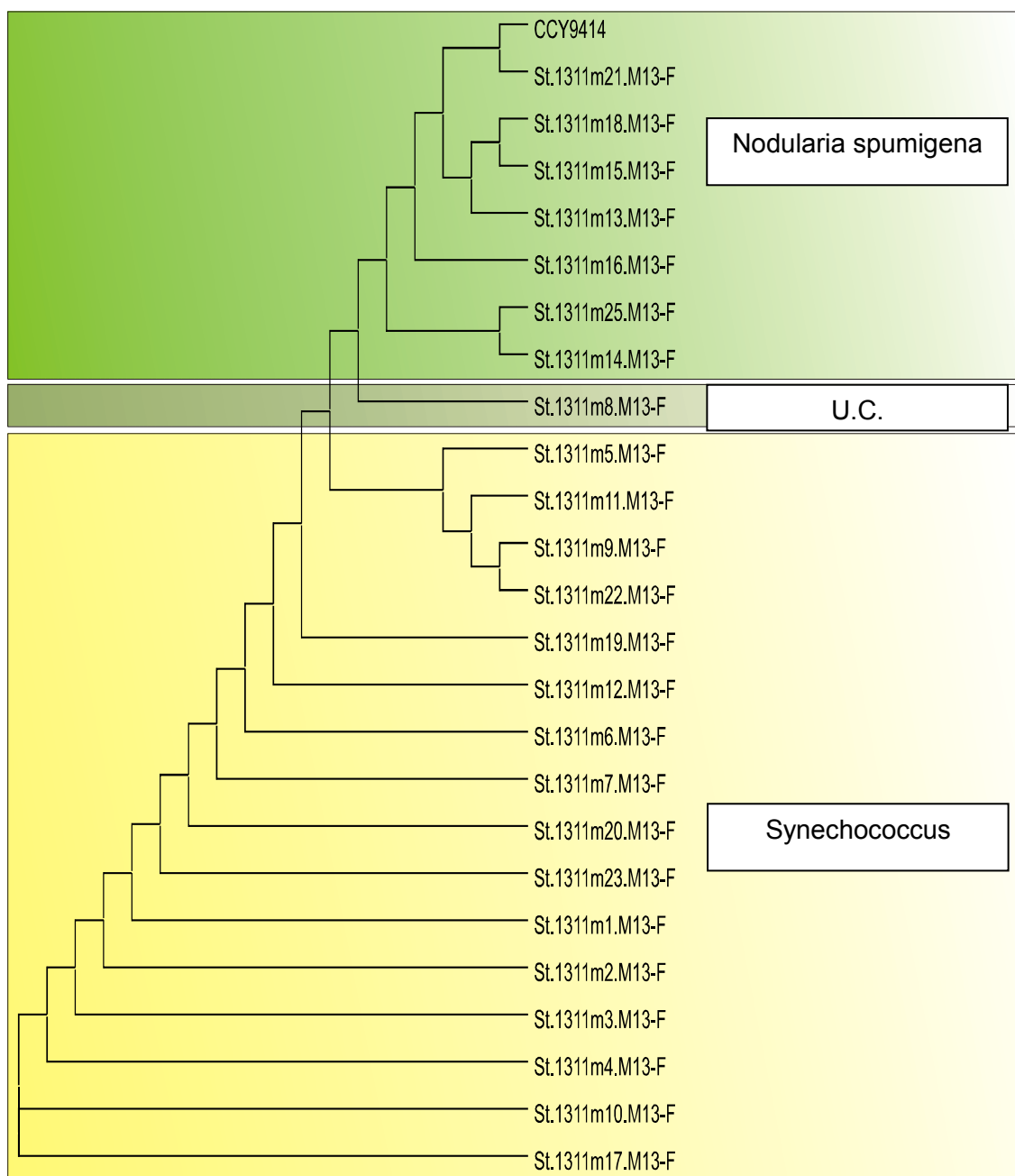
**Referenzbäume Ostseeproben****Station 46 Pütz**

U.C. Uncultured Cyanobacteria



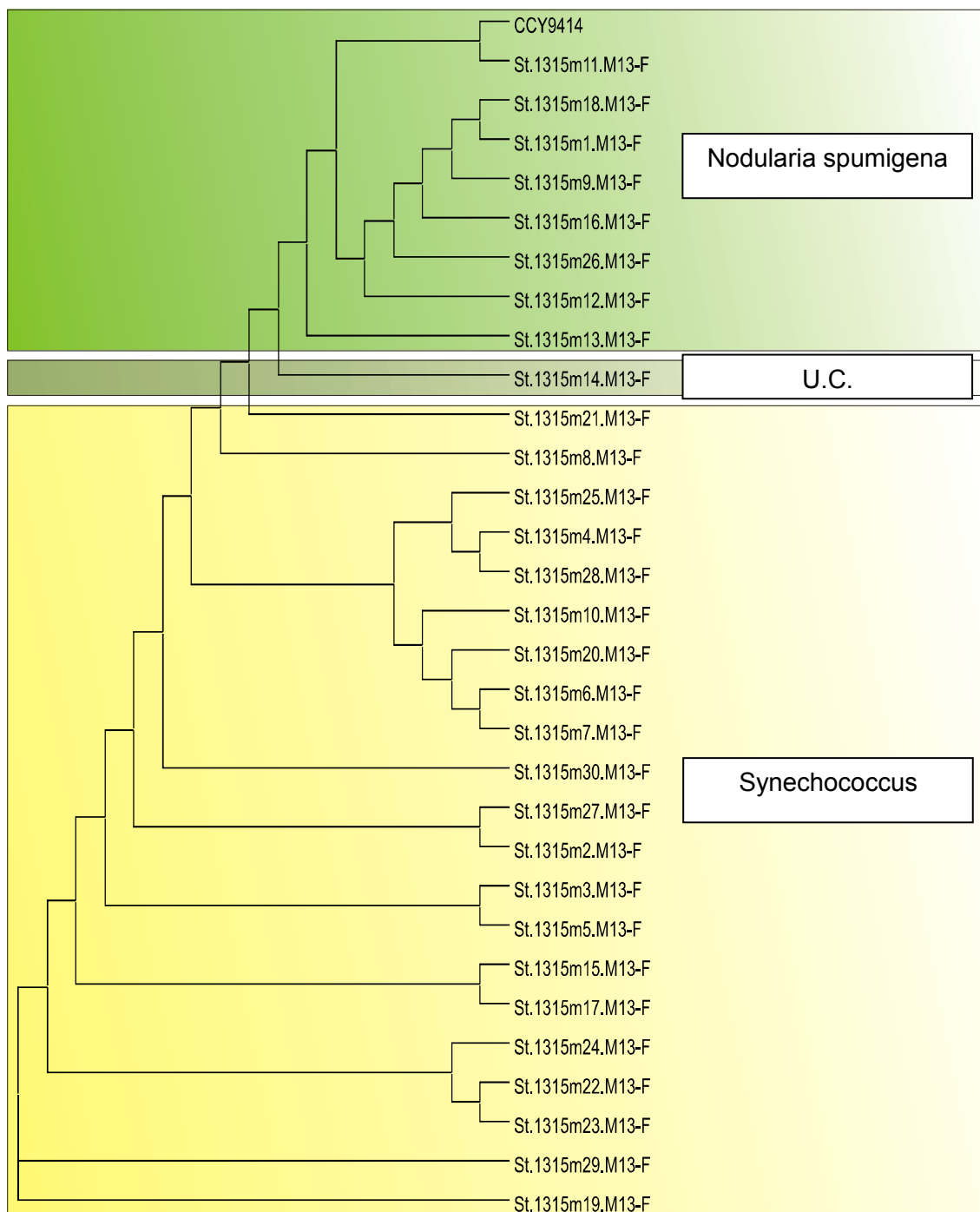
**Station 46 1m**

**Station 113 1m**



U.C. Uncultured Cyanobacteria

**Station 113 5m**



U.C. Uncultured Cyanobacteria